UNIVERSITÉ DE LYON FACULTÉ MIXTE
DE MÉDECINE ET DE DE PHARMACIE

Année 1962 N° 488

TITRE DE LA THÈSE

Contribution à l'Etude des Photosensibilisants

THÈSE

Pour le Doctorat de l'université de Lyon
Section de Pharmacie
présentée
à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon
et soutenue publiquement le 15 Janvier 1962
par

Jacques DUGOIS
né le 2 Juillet 1935
à LA TRONCHE (Isère)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550013_0024

UNIVERSITÉ DE LYON FACULTÉ MIXTE
DE MÉDECINE ET DE DE PHARMACIE

Année 1962 N°

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

TITRE DE LA THÈSE

Contribution à l'Etude des Photosensibilisants

THÈSE

Pour le Doctorat de l'université de Lyon
Section de Pharmacie
présentée
à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon
et soutenue publiquement le 15 Janvier 1962
par

Jacques DUGOIS
né le 2 Juillet 1935
à LA TRONCHE (Isère)

Faculté Mixte de Médecine
& de Pharmacie de LYON

PERSONNEL de la FACULTE

M.J. LEPINE : Doyen Honoraire
Membre de l'Institut

M.H. HERMANN : Doyen
Correspondant de l'Institut

MMrs: M. LEVRAT Assesseur
L. REVOL, Assesseur

Professeurs Honoraires

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY.

Professeurs

MM. HERMANN	Physiologie
CIBERT	Clinique Urologique
PONTHUS (détaché à Beyrouth)	Physique biologique
DECHAUME	Clinique Neuro-Psychiatrique et Hygiène Mentale
ROCHET	Thérapeutique Chirurgicale et Chirurgie Opératoire
CHAMBON	Chimie Organique et Toxicologie
WERTHEIMER	Clinique Chirurgicale B
PAUPERT-RAVAULT	Clinique Médicale B
FROMENT	Clinique et Prophylaxie Cardio-Vasculaire
CROIZAT	Clinique Médicale C
ENSELME	Clinique Biologique et Médicale
MALLET-GUY	Clinique Chirurgicale A
GUILLEMINET	Clinique de Chirurgie Orthopédique et de Chirurgie Infantile
REVOL	Pharmacie Galénique et Matière Médicale
POLLOSSON	Clinique Gynécologique
PIGEAUD	Clinique Obstétricale
BOURRET	Médecine du Travail
LEVRAT	Clinique Médicale A
SOHIER	Hygiène et Action Sanitaire Sociale
DUCLOS	Clinique Stomatologique
BERNHEIM	Clinique Médicale Infantile et Hygiène du Ier Âge
JOURDAN	Biologie Médicale et Pharmacodynamie
NETIEN	Botanique et Cryptogamie
BERTRAND	Clinique Chirurgicale C
BADINAND	Chimie Analytique Pharmaceutique
ROCHE	Médecine Légale et Déontologie
COUDERT	Parasitologie et Pathologie Exotique
MOUNIER-KUHN	Clinique d'Oto-Rhino-Laryngologie & d'Audio-Phonologie
PAUFIQUE	Clinique Ophtalmologique
THIERS	Clinique de Dermatologie, syphiligraphie et Allergologie
BRUN	Clinique de Pneumo-Phtisiologie
CREYSSEL	Clinique Traumatologique des Membres
DARGENT	Cancérologie
GUICHARD	Anatomie Pathologique
Girard Paul	Pathologie Générale et Expérimentale
LATARJET	Anatomie

MM. PEYCELON — Pathologie Chirurgicale
GIRARD Marcel — Thérapeutique
VACHON — Pathologie Médicale
GALY — Physio-pathologie des Voies Respiratoires
KEHL — Histologie et Embryologie
PAPILLON — Radiologie
JEUNE — Clinique des Maladies Infectieuses
GONIN — Hydrologie thérapeutique, Climatologie et Ecologie Sociale
MONNET — Bactériologie

Professeurs à Titre Personnel

BERGER — Physique Nucléaire appliquée à la Médecine
DORCHE — Technologie Pharmaceutique

Professeurs sans Chaire

BANSSILLON — Obstétrique
ROMAN — Parasitologie
BERTOYE — Bactériologie
CIER J. François — Physiologie
CHATONNET — Physiologie
CIER André — Pharmacie Chimique & Pharmacologie
PERROT — Chimie organique & toxicologie.

Maitres de Conférences Agreges

Médecine

FEROLDI — Anatomie Pathologique
CREYSSEL Roger — Chimie Biologique et Médicale
DUROUX Emile — Anatomie
BRETTE René — Thérapeutique
DUMONT Louis — Histologie
THIVOLLET Jean — Hygiène
GARIN Jean Paul — Parasitologie
MORET Robert — Physique
BOUCHET Alain — Anatomie
TOMMASI Michel — Anatomie Pathologique
RIFFAT Georges — Hygiène
JOUVET Michel — Pathologie Expérimentale
FAVRE-GILLY Jean — Hématologie

Pharmacie

ODDOUX Lucien — Botanique et Cryptogamie
MALLEIN René — Chimie Analytique
GRAS Jean — Chimie Biologique
PEYRIN Jean-Ollivier — Physique

Agrégés en Exercice

MM. MATHIEU Jacques — Obstétrique
MARION Joseph — Orthopédie
GUINET Paul — Médecine Générale
PONT Maurice — Médecine Générale

MM.	VIGNON Georges	Médecine Générale
	REVOL Louis	Médecine Générale
	PLAUCHU Marcel	Médecine Générale
	TRAEGER Jules	Médecine Générale
	MARION Pierre	Chirurgie Générale
	MICHAUD Pierre	Chirurgie Générale
	JAUBERT de BEAUJEU Michel	Chirurgie Générale
	SAUTOT Jean	Chirurgie Générale
	GUILLEMIN Georges	Chirurgie Générale
	BURTHIAULT René	Obstétrique
	GIGNOUX Marcel	Oto-Rhino-Laryngologie
	FRANCOIS René	Pédiatrie
	FREIDEL Charles	Stomatologie
	DEVIC Michel	Médecine Générale
	DESPIERRES Charles	Médecine Générale
	de MOURGUES Georges	Chirurgie Générale
	FRANCILLON Jacques	Chirurgie Générale
	SAUBIER Eugène	Chirurgie Générale
	COLOMB Daniel	Dermatologie
	COLIN Marcel	Médecine Légale
	TOLOT François	Médecine du travail
	GUYOTAT Jean	Neuro-Psychiatrie
	SCHOTT Bernanrd	Neuro-Psychiatrie
	DUMONT Martial	Obstétrique
	BONAMOUR Georges	Ophtalmologie
	DURAND Louis	Urologie
	GARDE Alexandre	Médecine Générale
	PERRIN André	Médecine Générale
	LARBRE François	Médecine Générale
	MORNEX René	Médecine Générale
	NORMAND Jean	Médecine Générale
	MARET Gilbert	Chirurgie Générale
	DESCOTES Jacques	Chirurgie Générale
	CHASSARD Jean-Louis	Electro-Radiologie
	ALLEGRE Georges	Neuro-Chirurgie
	HUGONNIER René	Ophtalmologie
	FAYSSE Robert	Orthopédie
	GAILLARD Jean	Oto-Rhino-Laryngologie
	KALB Jean-Claude	Pneumo-Phtisiologie

Examinateurs de la Thèse :

Président ....M. H. THIERS

Assesseurs....M. G. NETIEN

M. B. DREVON

M. G. CARRAZ

A mes PARENTS

Que ce travail soit pour eux un modeste témoignage de ma reconnaissance et de ma profonde affection.

A MA FEMME

A tous les MIENS

A mes AMIS

A notre Président de THESE

Monsieur le Professeur H. THIERS
Professeur de la Clinique Dermatologique de LYON

Il a bien voulu accepter ce travail et nous faire le grand honneur de présider notre Jury.

Nous le prions de trouver ici l'expression de notre respectueuse reconnaissance.

A nos JUGES

Monsieur le Professeur G. NETIEN

Nous le remercions d'avoir accepter de juger ce travail .

Qu'il trouve ici le témoignage de notre respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur B. DREVON

Il a bien voulu nous faire l'honneur de sieger parmi nos juges.

Nous le prions de trouver ici le témoignage de notre reconnaissance.

Monsieur le Professeur G. CARRAZ

Après nous avoir fait tout au long de nos études bénéficier des qualités de son enseignement, il eut la grande amabilité de nous accueillir dans son laboratoire.

Par ses conseils bienveillants et avisés, il fut alors pour nous un guide constant dans nos travaux et dans la rédaction de notre ouvrage.

Qu'il veuille bien trouver ici un modeste témoignage de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur SEIGNEURIN

Qui a bien voulu nous accueillir avec beaucoup d'amabilité dans son laboratoire et nous diriger dans la partie bactériologique de nos travaux.

Nous voudrions lui présenter ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

Au Docteur R. MAGNIN

A Madame J. FILS

A Monsieur le Professeur A. COEUR

Après nous avoir fait bénéficier d'un enseignement dont nous avons su apprécier la valeur, il nous a permi avec une grande bienveillance, de réaliser les irradiations si nombreuses que demandait notre travail.

Qu'il trouve ici le respectueux témoignage de notre reconnaissance.

A nos MAITRES de l'Ecole de Pharmacie
de GRENOBLE

Madame DEBELMAS

Monsieur BOUCHERLE

Monsieur RINALDI

Monsieur LACHARME

Nous leur exprimons notre respectueuse reconnaissance pour leur enseignement.

A Monsieur le Professeur Agrégé P. DUGOIS

Il nous a orienté vers le sujet de cette thèse et nous a toujours conseillé avec la plus grande bienveillance.

Nous lui devons d'avoir pu noter les observations cliniques que nous présentons .

Qu'il voi.t ici le témoignage reconnaissant de notre profond attachement.

Au Personnel du Laboratoire de Sciences Naturelles et particulièrement :

A Madame H. BERIEL

A Mademoiselle C. BURNOT

Qui avec la plus grande bienveillance a conduit pour nous les mesures à l'appareil de Warburg.

Nous l'assurons de notre amicale et très reconnaissante sympathie.

Nous remerçions les laboratoires TORAUDE qui, par la bienveillante entremise de Monsieur BRETTE, ont mis à notre disposition le BACTISUBTIL à partir duquel nous avons élaboré notre suspension cellulaire.

Nous adressons nos remerciements à la Direction de la Société PROGIL, à Pont-de-Claix (Isère) qui nous a permis de disposer de nombreux dérivés chlorés du phénol.

I N T R O D U C T I O N

Le but du travail que nous avons entrepris était de rechercher un photosensibilisant qui, suivant le désir de Monsieur le Professeur Agrégé DUGOIS, devait réunir les propriétés suivantes : être incolore, antiseptique, si possible réducteur et évidemment non toxique.

La première qualité était demandée parce qu'il fut reconnu qu'en pratique les malades répugnaient à entretenir chez eux un traitement avec un colorant aussi voyant que l'éosine. Les autres propriétés recherchées devaient nous faire espérer des résultats aussi satisfaisants que ceux obtenus par l'emploi de ce colorant notamment dans le traitement des psoriasis.

Notre première tâche fut évidemment de mettre au point une technique de mesure de l'activité photosensibilisante. Diverses méthodes actuellement connues et décrites seront mentionnées au cours de cette thèse mais dès l'abord nous devons reconnaître que leur plus fréquent inconvénient réside en la longueur de leur exécution, incompatible avec un travail de longue prospection dans les séries éventuelles de photosensibilisants.

Aussi avons-nous d'abord, dans le laboratoire et sous la direction de Monsieur le Professeur CARRAZ, cherché à mettre au point une méthode de mesure qui nous permettrait des essais en série.

Nous verrons que nous sommes parvenus à codifier une technique rapide en prenant comme cellule cible le Bacille subtilis qui présente les avantages d'être facilement obtenu en culture abondante et d'être très avide d'oxygène. L'action des photosensibilisants est appréciée par leurs effets sur sa consommation d'oxygène mesurée à l'appareil de WARBURG, ce qui peut être fait en une heure alors que la détermination de l'effet léthal de l'irradiation exige plusieurs jours.

Grâce à ce test, nous avons d'abord étudié les propriétés photosensibilisantes de plusieurs dérivés de la phénothiazine dont en particulier la chlorpromazine. Au chapitre traitant de ces molécules, nous verrons les raisons de ce choix qui pouvait pourtant nous éloigner du but primitif de ce travail. Nous risquions en effet de rencontrer dans cette série de substances dont les propriétés allergisantes constituent habituellement un handicap en dermatologie. Cependant, grâce à eux, nous avons pu dégager quelques principes pharmacodynamiques que nous avons ensuite cherché à vérifier dans d'autres séries chimiques : résorcinol, dérivés halogénés du phénol et dérivés du triphénylméthane dont le principal, l'éosine, est bien connu en dermatologie. Nous avons enfin étudié l'un des principes actifs de l'Ammi majus, la xanthotoxine.

En conséquence, le plan de ce travail s'établit comme suit :

Définition des photosensibilisants. Mode d'action.
Principales techniques de mesure.
Technique personnelle.
Recherches sur les dérivés phénothiaziniques.
Recherches sur les phénols et phénols halogénés.

Recherches sur les dérivés du triphénylméthane.
Recherches sur la xanthotoxine.
Résultats cliniques.
Discussion générale.
Conclusions.

DEFINITION DES PHOTOSENSIBILISANTS — LEUR MODE D'ACTION

Dans une note préliminaire nous écrivions (9) : "Du point de vue pharmacodynamique, soit en excluant toute notion d'activateur de réaction se développant dans un système où ne sont pas impliqués des organismes vivants, les photo et les radiosensibilisants sont généralement définis comme des substances qui sensibilisent les cellules à l'action des radiations électromagnétiques (pour les photons et les rayons X) et à l'action des radiations corpusculaires". Si l'on s'en tient à ce qui fut le sujet essentiel de notre travail, à savoir la sensibilisation aux radiations U.V. et visibles, nous constatons à propos du mécanisme de leur action que la plupart des auteurs admettent une interréaction entre le photosensibilisant et la cellule cible, préalablement à l'effet des photons. Un exemple entre autres : HEINMETS et VINEGAR (20) qui étudient le phénomène sur Escherichia Coli, admettent la formation d'un complexe cellule-activateur puis l'action des photons sur le complexe.

Les investigations que nous avons faites conduisent, au moins dans certains cas, à formuler une autre hypothèse. A savoir : sous l'action de radiations électromagnétiques, (en particulier des U.V.) certaines substances photosensibilisantes se transforment par photolyse en un ou plusieurs produits nouveaux dont les propriétés pharmacodynamiques sont différentes de celles de la substance initiale. Ces produits de photolyse exercent alors sur la cible vivante des effets voisins sinon

identiques à ceux des photons activés, et ceci même en l'absence de toute irradiation, ce qui conduit non seulement à une interprétation différente du mécanisme pharmcodynamique de l'action photosensibilisante et partant à des hypothèses de travail nouvelles, mais ce qui conduit à une nouvelle notion pharmacologique : celle des photomimétiques.

Nous discuterons après l'exposé de la partie expérimentale si cette théorie apparaît suffisamment bien fondée sur les faits d'expérience et nous tâcherons d'en tirer les bases d'une nouvelle prospection, mais dès maintenant il faut bien reconnaître que ce que nous essayons de dégager serait bien dans la ligne des principes généraux de la photochimie.

On sait que les réactions chimiques s'élaborent au niveau des couches électroniques entourant les atomes qui constituent les molécules. Ces couches doivent se rapprocher suffisamment pour que se forme entre ces atomes un complexe dit activé, dont la destruction engendre des molécules nouvelles. Pour contraindre deux molécules nouvelles à former ce complexe, un apport d'énergie, dite énergie d'activation, est nécessaire. L'énergie d'activation mobilisée est souvent l'énergie thermique mais les radiations électromagnétiques ou corpusculaires constituent d'autres formes d'énergie d'activation.

La molécule activée peut se comporter de différentes manières. Si elle est activée par la lumière visible ou ultraviolette, un électron est déplacé à l'intérieur de la molécule et peut tomber à un niveau inférieur d'énergie, émettant de la lumière et produisant de la fluorescence. Cette molécule peut, en en rencontrant une autre, la renvoyer avec une plus grande vitesse, augmentant ainsi l'énergie cinétique et la température. Cette conversion en chaleur sans réaction chimique est l'effet le plus fréquent de la lumière absorbée.

Parfois l'électron déplacé conduit à un réarrangement des atomes ou à une dissociation de la molécule donnant ainsi une réaction photochimique.

La molécule activée avec son électron déplacé peut encore transmettre son énergie à une autre molécule par un choc la dissociant, en la faisant réagir chimiquement. C'est ainsi que FARRINGTON DANIELS (14) définit la photosensibilisation.

NOUS VERRONS QU'UNE PROPRIETE PHARMACOCHIMIQUE FONDAMENTALE DE CERTAINES SUBSTANCES DITES PHOTOSENSIBILISANTES RESIDE DANS LE FAIT QUE L'ACTIVATION PAR LES U.V. OU LA LUMIERE VISIBLE CONDUIT A DES SUBSTANCES NOUVELLES ET STABLES QUI ONT DES PROPRIETES PHARMACODYNAMIQUES NOUVELLES.

PRINCIPALES TECHNIQUES DE MESURE

Nous ne pensons pas énumérer ici toutes les techniques qui ont été publiées et qui se proposent de mesurer les effets des photosensibilisants. Celles que nous citons, donnent une idée des bases sur lesquelles ont été fondées les techniques d'étude.

C'est au début du siècle que RAAB (27) publie les résultats de ses expériences concernant l'effet de l'acridine sur les paramécies.

HAI (19) en 1939 injecte à un lapin des doses données de trypaflavine et, après 24 heures, une exposition de la muqueuse buccale de l'animal à la lumière du soleil ou d'une lampe à arc de carbone donne une congestion locale, avec érosion et ulcération.

URBANI (34) en 1945, mesure avec un respiromètre de BARCROFT la consommation d'oxygène des têtards de Rana esculenta, exposés à la lumière solaire ou à la lumière diffuse avec ou sans addition d'éosine.

En 1947, MATOLTSY A. et FABIAN G. (25) mesurent sur les oeufs d'une drosophile l'effet photodynamique de divers composés chimiques dont le 3.4-benzopyrène, le méthylcholanthrène et le dibenzanthracène.

Ils notent dans chaque cas le temps d'irradiation nécessaire (lampe à quartz) pour tuer les oeufs.

SCHULDNACHER H. (32) en 1950 décrit l'effet de protosensibilisation léthale de plusieurs colorants fluorescents sur des larves de moustiques pour des concentrations et des irradiations données.

Plusieurs auteurs emploient comme cellule-cible la paramécie à l'exemple de RAAB. BILLIG E. et NEIFAKH S. (2) mélangent en 1941 une suspension de paramécies dans du Ringer-peptoné à une solution aqueuse de 3-4-benzopyrène de titre connu et irradient par une lampe de quartz munie d'un filtre ne laissant passer que les longueurs d'onde comprises entre 290 et 400 millimicrons. Ils notent la durée de l'irradiation léthale.

Suivant une technique voisine, CALCUTT G. et NEWHOUSE J. (6) en 1948, mesurent les effets de différents composés à fonction -SH sur le mélange paramécies 3-4-benzopyrène. Pour des temps d'irradiation donnés ils observent des réactions d'immobilisation ou de cytolyse.

Un peu plus tard, en Italie, MUSAJO J. (26) mesure sur l'épiderme humain l'activité photosensibilisante de 33 dérivés de la coumarine. La surface irradiée et la concentration de la solution testée sont connues. L'irradiation par la lumière solaire ou par des rayons ultra-violets longs donne pour certains de ces dérivés de typiques réponses cutanées d'érythème et d'oedème.

Dans les techniques suivantes, les cellules-cibles sont des bactéries.

HELMKE R. (21) en 1955, note l'effet photosensibilisant de diverses substances organiques hydrosolubles et fluorescentes (dont l'éosine) sur des bactéries Coli B. irradiées par des rayons U.V. courts. Il note dans quelles proportions est augmenté le nombre des mutations.

FOWLKS W., GRIFFITH D. et OGINSKY E. (17) donnent en 1958 une méthode permettant d'apprécier quantitativement les effets photosensibilisants des furocoumarines et de dérivés voisins, sur des bactéries Gram$^+$ (B.subtilis, S.aureus, S. foecalis) et Gram$^-$ (E.coli, P. vulgaris, P.aeruginosa). Ils exposent pendant vingt minutes à la lampe à vapeurs de mercure munie d'un filtre, les cultures de bactéries sur lesquelles les photosensibilisants ont diffusé à partir de petits disques de papier filtre. La largeur de la zone d'inhibition représente l'activité du composé testé.

En 1959 enfin, EVELYN et FOWLKS (12) codifient une technique précise et mesurent la photosensibilisation léthale de trois bactéries (S.auréus et deux E.Coli) par la xanthotoxine, en présence de rayonnements U.V. longs. Après l'irradiation, la numération des bactéries vivantes est faite suivant la méthode des dilutions.

Il n'est pas dans notre but de faire une critique de chacune de ces méthodes. Notons cependant les aléas bien connus d'une notation quantitative basée sur le diamètre des disques d'inhibition, (la pratique quotidienne des antibiogrammes a donné lieu à suffisamment de notes à ce sujet). Notons encore combien est laborieuse la détermination de la léthalité par les dilutions successives. Sans vouloir prétendre que la méthode que nous avons mise au point est exempte de toute critique, nous pouvons écrire que, mieux que la description que nous allons maintenant en donner, une assez longue pratique quotidienne en démontre la commodité.

TECHNIQUE PERSONNELLE

§§§

Principe

On apprécie l'effet de l'irradiation, en l'absence et en présence du photosensibilisant, par la diminution de la consommation d'oxygène d'une bactérie non pathogène, facile à cultiver, et très avide d'oxygène, à savoir Bacillus subtilis. Les mesures de consommation d'oxygène ont lieu toutes les quinze minutes, pendant une heure, à l'appareil de Warburg, à 37°C.

Effet photosensibilisant

Disposant de 14 manomètres, dont 2 servent à la détermination des "blancs", 12 manomètres sont disponibles, dont :

- 3 servent à la mesure de la consommation de la souche témoin.
- 3 servent à la mesure de la consommation de la souche irradiée sans photosensibilisant.
- 3 servent à la mesure de la consommation de la souche en présence du photosensibilisant, et sans irradiation.
- 3 servent à la mesure de la consommation de la souche irradiée en présence du photosensibilisant.

Dans chacun des cas, la valeur retenue est représentée par la moyenne de celles fournies par les trois manomètres : soit respectivement a, b, c et d. La consommation de la souche témoin

étant ramenée à 100, les valeurs obtenues dans les autres cas sont exprimés en pour cents par rapport à elle. Nous avons ainsi:

$$\frac{a.100}{a} = 100 = A$$

$$\frac{b.100}{b} = B$$

$$\frac{c.100}{c} = C$$

$$\frac{d.100}{d} = D$$

Exprimées en pourcentage, les valeurs obtenues sont beaucoup plus aisément comparables. Nous les interprétons alors de la façon suivante :

Diminution due à l'irradiation seule . . . . . A - B.

Diminution due au produit testé seul . . . . . A - C.

Diminution due à l'irradiation en présence du produit testé . . . . . A - D.

L'effet du photosensibilisant pour cent est donc :

$$PS = (A - D) - (A - B) - (A - C).$$

C'est de cette façon que nous avons déterminé l'effet photosensibilisant des divers produits étudiés.

Effet photomimétique

Lorsque nous aurons à étudier l'effet du produit irradié à part, et ajouté ultérieurement à la souche non irradiée, ou effet "photomimétique", le principe est le suivant :

- 3 manomètres servent à la mesure de la consommation de la souche témoin.
- 3 manomètres servent à la mesure de la consommation de la souche en présence du photosensibilisant, et sans irradiation.
- 3 manomètres servent à la mesure de la consommation de la souche en présence du produit qui, seul, a déjà été irradié à part.

Comme précédemment, nous obtenons ici trois valeurs moyennes : respectivement : a, c, et e, qui,exprimés en pourcentages, deviennent :

$$\frac{a.100}{a} = 100 = A$$

$$\frac{c.100}{c} = C$$

$$\frac{e.100}{e} = E$$

Si nous retranchons l'effet propre du produit non irradié, de l'effet obtenu avec le produit irradié à part, son effet photométique s'exprime de la façon suivante :

$$Pm = (A - E) - (A - C).$$

Conditions favorables à des mesures sensibles

Nous avons recherché, pour la suspension de Bacillus subtilis qui sera diluée de moitié dans l'appareil de Warburg, une densité optique mesurable, aussi élevée que possible, donnant pour la consommation d'oxygène de la souche témoin une valeur aussi grande que possible. Nous l'avons fixée à environ 150° Vernes.

D'autre part, nous avons cherché, pour chacun des produits dont nous avons étudié l'action, la concentration maxima qui ne diminue pas, ou diminue peu la consommation d'oxygène de la suspension cellulaire, en l'absence d'irradiation.

Dans le même sens, il importait de choisir un temps d'irradiation qui soit peu toxique pour la cellule cible, mais assez important pour faire nettement apparaître un éventuel effet de photosensibilisation. La durée de cette irradiation, qui a été de deux minutes dans la majeure partie de nos mesures, a été utilement ramenée à une minute.

Par contre, lorsqu'un produit est irradié à part, le temps d'irradiation est souvent beaucoup plus long (quinze ou trente minutes), ce qui permet, sans aucun dommage pour la cellule cible, d'accentuer éventuellement la production de substances photomimétiques.

Irradiation

Nous employons une lampe de quartz à fluorescence du type Paris-Labo modèle 361 qui nous fournit les bandes du spectre d'émission du mercure. Elle peut être munie d'un filtre de Wood en verre noir à l'oxyde de nickel qui arrête les radiations visibles sauf le rouge extrême, et laisse passer les ultra-violets jusqu'à 300 millimicrons.

Le tableau de classification des photosensibilisants et des régions actives du spectre qui leur correspondent nous a incité à ne pas employer de filtre lorsque nous cherchons à révéler un composé éventuellement actif. Le spectre d'émission du mercure ne fournissant qu'un nombre limité de longueurs d'onde, nous avons préféré n'en masquer aucune.

Par contre, il nous parait évident que pour chacun des composés chimiques qui se révèlerait actif, il serait utile de déterminer le spectre d'action.

La source est située à 30 centimètres de la cible et nous allumons la lampe cinq minutes avant l'irradiation.

PREPARATION DE LA SUSPENSION DE BACILLUS SUBTILIS

Toute la partie bactériologique de nos travaux sera conduite dans les habituelles conditions de stérilité, et le matériel en verre stérilisé au four Pasteur à 170°C pendant vingt minutes.

La souche cible est obtenue à partir d'une ampoule de Bactisubtil utilisé en thérapeutique. Dans sa forme spécialisée en pharmacie, cette bactérie est en grande partie sporulée. On la régénère par 2 passages successifs, l'un de 17 h., l'autre de 7 h. sur gélose ordinaire.

Composition :

15 g	Agar agar
5 g	ClNa
5 g	Peptone
2 g	Extrait de levure
1 g	Extrait de viande
1000 g	Eau distillée

Ce mélange est dissout et stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant vingt minutes. Le pH à vérifier est de 7,2.

Nous coulons 20 ml de la solution gélosée fondue dans des boites de Pétri de 12 centimètres de diamètre et dans des tubes inclinés, avant de laisser refroidir et figer la gélose. Les milieux en boite sont en partie séchés par un passage à l'étuve à 37°C pendant dix minutes puis sont conservés à 4°C. Les tubes, après avoir été stérilisés à l'autoclave, sont conservés bouchés à la température du laboratoire.

Première culture : à 37° pendant 17 heures.

Cette culture est faite en tube sur G.O. inclinée. Après avoir longuement agité une ampoule de Bactisubtil, nous prélevons 1 ml de la suspension bactérienne que nous étendons sur toute la surface du milieu de culture. Son bouchon n'étant pas vissé à fond, le tube est placé à l'étuve à 37°C pendant 17 heures. Nous obtenons ainsi un voile de culture bactérienne qui, mis en suspension dans le liquide qui l'accompagne, sera ensemencé sur boite de Pétri.

Des délais beaucoup plus courts, de 7 heures, ont tout d'abord été employés, mais les cultures obtenues étaient insignifiantes et après plusieurs essais nous avons retenu le délai de 17 heures, qui, par ailleurs s'accorde bien avec nos horaires de travail.

Deuxième culture : à 37° pendant 7 heures.

Cette culture est faite sur boite de Pétri qui, sortant du réfrigérateur, doit tout d'abord être ramenée à une température normale. La surface du milieu est alors ensemencée à l'écouvillo avec la suspension précédemment obtenue, puis la boite, fermée et retournée, est placée à l'étuve pendant 7 heures. Nous obtenons alors un très beau voile blanchâtre de B.subtilis en phase de grande activité.

Milieu de survie.

Détachées de leur milieu de culture, les bactéries seront placées jusqu'à la fin de notre test dans un milieu de survie et nous avons choisi à cet effet la solution de KREBS-RINGER décrite par COHEN (10).

Cinq solutions entrent dans sa composition :

1. 0,90 % NaCl (0.154 M)
2. 1,15 % KCl (0.154 M)
3. 1,22 % Ca C12 (0.11 M)
4. 2,11 % KH2PO4 (0.154 M)
5. 3,82 % MgSO4, 7H2O (0.154 M)

Pour préparer la solution de KREBS-RINGER, il faut mélanger ces solutions dans les proportions suivantes :

100 parties de solution 1
4 parties de solution 2
3 parties de solution 3
1 partie de solution 4
1 partie de solution 5

Cette solution est conservée à la température de 4°C.

Lavage et mise en suspension concentrée des B.subtilis

Au terme de la seconde culture, le cycle de développement du bacille est interrompu par un "lavage" suivant la méthode décrite par R.BURRIS (4). Nous détachons facilement du milieu de culture le voile épais de B.subtilis par agitation dans 20 ml de solution de KREBS-RINGER.La suspension obtenue est centrifugée en ampoule conique pendant 10 minutes à 5000 tours/minute. Après décantation et élimination du liquide surnageant, le culot est remis en suspension dans 20 ml de solution puis centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Le culot, isolé, est mis en suspension concentrée homogène dans 2 ou 3 ml de solution de KREBS -RINGER en employant

un mince agitateur terminé par une boucle que nous faisons tourner dans l'ampoule conique. Cette suspension d'aspect laiteux est conservée au réfrigérateur à 4°C pendant 15 heures environ dans un flacon dont le bouchon est traversé par deux tubes de verre, l'un court, l'autre long plongeant dans le liquide.

Préparation d'une suspension sensible, de densité optique connue.

Au moment d'entreprendre le test proprement dit, la suspension concentrée est étendue de 10 ml de la solution de KREBS-RINGER qui était, comme elle, conservée à 4°C ; puis, toutes deux sont abandonnées à la lumière et à la température du laboratoire pendant 30 minutes. Cette pré-irradiation augmente l'intensité des effets ultérieurs recherchés, phénomène déjà observé par CALCUTT (5) sur des cultures de Paramécies. A l'aide du spectrophotomètre "spectral junior" Jouan (réf.1560) la densité optique de la suspension est ensuite amenée à 150° Vernes. La suspension de B.subtilis dans la solution de KREBS-RINGER est alors prête à être immédiatement employée.

Préparations et traitements divers des mélanges dont on mesurera la consommation d'oxygène

La préparation des solutions et des mélanges est faite en lumière rouge, dans une pièce obscure. La molécule dont on veut étudier les propriétés est mise extemporanément en solution dans le liquide de KREBS-RINGER à une concentration double de la concentration finale voulue. Remarquons ici que la concentration optima, telle que nous l'avons décrite plus haut, ne peut en général être arrêtée qu'après plusieurs expériences.

Dans des boîtes de Pétri de 9 centimètres de diamètre, la suspension bactérienne est alors mélangée en parties égales (4 + 4 millilitres) avec la solution de KREBS-RINGER pure ou contenant le produit à étudier. La densité optique de la suspension est alors de 70-75° Vernes.

Lorsque le produit testé doit être irradié seul, cette irradiation est faite dès avant le mélange ; dans les autres cas, par contre, et lorsqu'elle est nécessaire, elle est faite sitôt après le mélange final. La largeur de la plage de la lampe permet l'irradiation simultanée de deux boîtes, ce qui élimine une variante possible quant aux radiations émises par la source lumineuse.

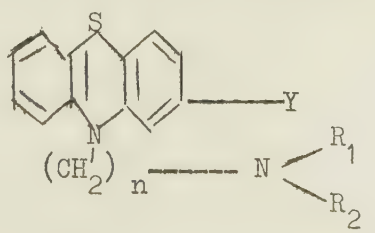
Après un délai de deux heures qui n'est dû qu'à notre horaire de travail, les mesures de la consommation d'oxygène sont faites, dans chacun des manomètres de l'appareil de Warburg, sur 2,5 millilitres de suspension bactérienne.

DERIVES PHENOTHIAZINIQUES

L'action sensibilisante aux photons de la chlorpromazine est bien connue et a été largement décrite depuis l'emploi clinique massif de ce médicament, mais il est apparu qu'elle s'étendait aux autres radiations électromagnétiques (rayons X) et même que le largactil potentialisait l'action des radiomimétiques. Ce sont les observations cliniques de BACIGALUPO et LUHRS (1) en Allemagne, qui révèlèrent que la chlorpromazine sensibilise aux rayons X des tumeurs devenues radiorésistantes, ce qui permis la reprise efficace de la radiothérapie. Ces auteurs admettent que la chlorpromazine agit en augmentant les réactions de phosphorylation oxydative de la cellule cancéreuse.

CARRAZ (7) reprenant l'étude de ces propriétés sur la cellule isolée de la tumeur ascitique d'Ehrlich par centrifugation du liquide de ponction de plusieurs souris Swiss cancérisées depuis huit jours avec 0,5ml d'ascite contenant 75.000 cellules par millimètre cube, a d'abord confirmé que la chlorpromazine sensibilise en effet ces cellules à l'irradiation par les rayons X. Il a montré, par contre, que la consommation d'oxygène par la cellule cancéreuse était influencée de façons différentes suivant la dose : les très faibles concentrations augmentant la consommation d'oxygène, alors que les concentrations plus importantes la diminuent (CARRAZ et BOUCHERLE (8)).

Cette activité est d'ailleurs l'apanage non seulement du largactil mais de toutes les amines neuroplégiques dérivées de la phénothiazine et de formule générale :



Quoiqu'il en soit, il apparaît bien que, parmi les nombreuses propriétés pharmacodynamiques de ces amines phénothiaziniques, le pouvoir sensibilisant aux radiations électromagnétiques présente un intérêt majeur et nous avons ainsi été amenés à examiner par la technique personnelle décrite, ce qui dans la structure chimique de ces molécules leur confère ou non l'activité photo et radiosensibilisante. Nous nous sommes attachés à mettre en évidence, pour certaines d'entre-elles, les propriétés photomimétogènes conformes à la définition que nous en avons donnée plus haut.

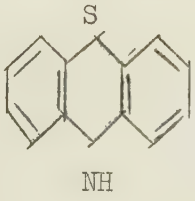
Nous présentons ci-dessous une étude des propriétés photosensibilisantes de dérivés phénothiaziniques en exprimant quantitativement les résultats obtenus. Nous montrons également que l'irradiation confère à la solution de certains de ces dérivés des propriétés "photomimétiques" en l'absence de toute irradiation de la cellule cible. Quelques résultats obtenus par irradiation aux rayons X sont également apportés, ainsi qu'une tentative de séparation chromatographique des produits de la réaction photochimique.

Les dérivés phénothiaziniques étudiés sont :

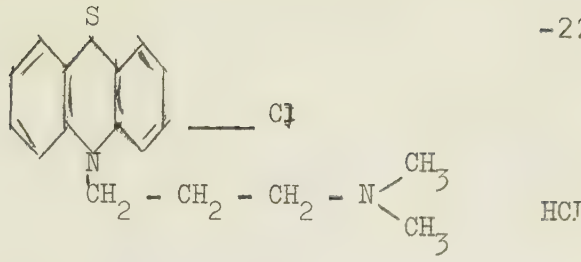
La phénothiazine
La chlorpromazine ou Largactil ou 4560 R.P.
La prométhazine ou Phénergan
L'alimémazine ou Théralène
La levomépromazine ou Nozinan ou 7044 R.P.
La prochlorpémazine ou Témentil
La méthopromazine ou Mopazine
La thionine ou Violet de Lauth
Le bleu de méthylène.

Formules développées des dérivés de la phénothiazine

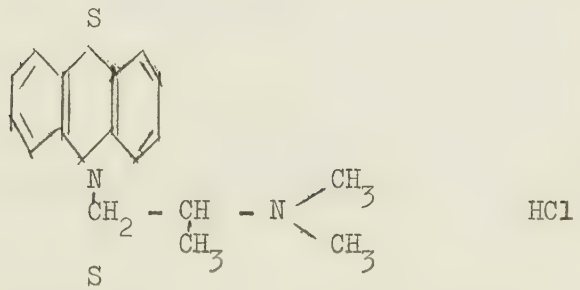
Phénothiazine



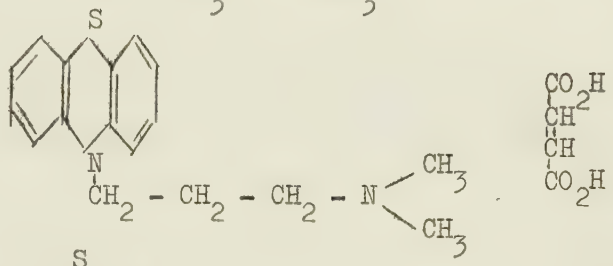
Chlorpromazine Largactil
4560 R.P.



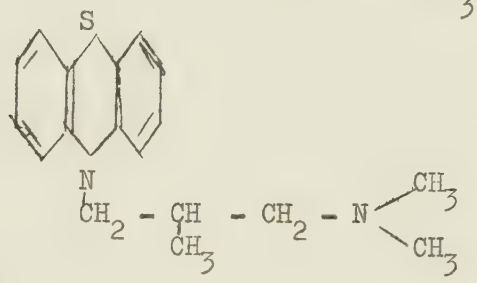
Prométhazine phénergan



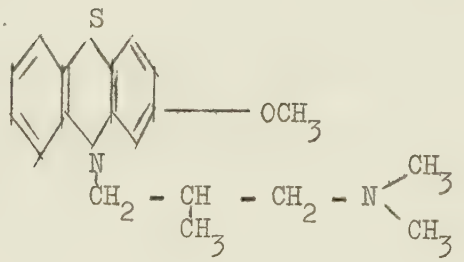
Méthopromazine (maléate)
mopazine



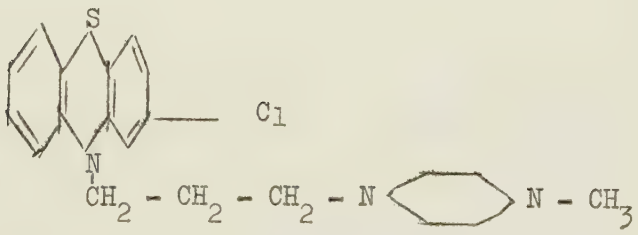
Alimémazine Théralène



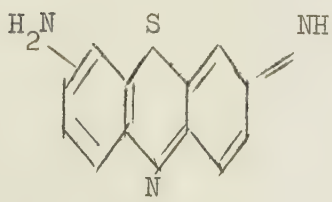
Lévomépromazine Nozinan
7044 R.P.



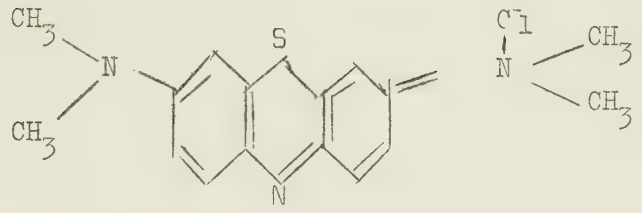
Prochlorpémazine Témentil



Thionine Violet de Lauth



Bleu de méthylène



Solubilisation de la phénothiazine dans l'eau.

Bromuration.

La phénothiazine étant insoluble dans l'eau, nous avons bromé cette molécule en solution éthérée suivant une technique proposée par KEHRMANN (23).

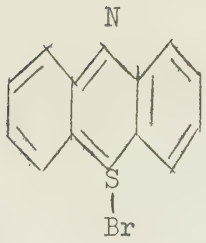
A une solution concentrée de phénothiazine dans l'éther que nous agitons constamment, nous ajoutons petit à petit et en excés, une solution éthérée de brome, préparée extemporanément. Il se produit alors au fur et à mesure que nous mélangeons ces deux solutions, un précipité brun-noir que nous isolons par décantation avant de le placer sur un filtre en verre poreux où il est longuement lavé à l'éther qui élimine l'excés de brome non combiné à la molécule.

Ce produit nouveau, séché est lentement soluble dans la solution de KREBS-RINGER à la concentration que nous avons arrêtée, qui est de l'ordre de 3.10^{-4}.

Sels d'azthionium obtenus.

Une telle oxydation de la thiodiphénylamine et de ses homogues, conduit à des produits colorés, de caractère salin, où l'atome de soufre apparaît comme tétravalent, et auxquels on a donné le nom de sel d'azthionium et attribué une structure orthoquinoïdique telle que la suivante :

Bromure de phénazthionium



Leur intérêt , nous le répétons, est uniquement pour nous de rendre les substances solubles, la solubilisation étant obtenue par la fixation extranucléaire du brome, ce qui permet une étude comparée de la phénothiazine et de ses dérivés. (tableau 1)

La formation de ces sels est vraisemblablement consécutive à celle de diphényl-amines-sulfoxydes. GRIGNARD (35) signale à ce propos l'incertitude du mécanisme de la réaction, laquelle peut procéder soit par migration d'hydrogène de N à S, soit plutôt par le transport d'hydroxyle de S à N. La question des sels d'azthionium est d'ailleurs très complexe et ces pdoduits ne seraient pas toujours de véritables sels. Ils constitueraient parfois des sortes de combinaisons moléculaires rappelant les quinhydrones.

Remarque : Concentrations des solutions de prochlorpémazine.

Nous verrons, dans la discussion générale, l'interprétation de ces résultats mais ici nous devons faire remarquer, à propos de la prochlorpémazine, que si elle a été utilisée à une concentration différente de celle des autres dérivés, c'est qu'à la même concentration le produit non irradié a un effet trop puissant sur le bacille subtilis pour qu'une détermination de son pouvoir photosensibilisant soit possible. En effet, à 5.10^{-5}, concentration que nous avons retenue pour les composés voisins de cette molécule, l'abaissement de la consommation d'oxygène est de 77 % en l'absence de toute irradiation. Un tel abaissement rend très mince la marge d'appréciation d'un effet de

photosensibilisation ; aussi avons-nous ramené le titre de cette solution à 2.10^{-5}. La prochlorpémazine montre alors des propriétés photosensibilisantes qui sont quantitativement très voisines de celles observées pour des concentrations de 5.10^{-5} de lévomépromazine et d'alimémazine. Une concentration de $3,5 \times 10^{-5}$ nous a d'autre part permis une étude satisfaisante des propriétés photosensibilisante et photomimétique de cette molécule.

LES CARACTERES DES MESURES PRESENTEES DANS LES TABLEAUX QUI SUIVENT SONT RANGES EN SIX COLONNES VERTICALES :

1°) Dénomination commune de la molécule étudiée.

2°) Concentration de la solution de cette molécule en présence de la suspension bactérienne.

3°) Description des conditions expérimentales.

4°) "Irradiation" temps d'irradiation en minutes. Sauf indication contraire, les irradiations sont faites sans filtre.

5°) Variations, en pourcentage, de la consommation d'oxygène, par rapport à celle de la souche témoin : non traitée et non irradiée. Les signes + ou - indiquent si la variation a lieu dans le sens d'une augmentation de la consommation d'oxygène (= ou dans le sens d'une diminution (-).

6°) Propriétés de la molécule :

P.S. exprime le pouvoir photosensibilisant tel que nous l'avons défini précédemment.

P.M. représente le pouvoir photomimétique, c'est-à-dire l'activité de la molécule irrédiée sans irradiation de la bactérie.

Les chiffres indiquent la diminution de la consommation d'oxygène en pourcentage par rapport à la consommation du témoin.

DERIVES DE LA PHENOTHIAZINE

Molécule étudiée	Concentration	Conditions expérimentales	Irradiation minutes	Effet %	Propriété PS ou PM
Phénothiazine bromée	15×10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	2 min.	-60	
		Suspension et Phénothiazine bromée non irradiée	0	-34	
		Suspension et Phénothiazine bromée irradiées ensemble	2 min.	-98	PS = 4
Phénothiazine bromée	5×10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	2 min.	-54	
		Suspension et Phénothiazine bromée non irradiée	0	-2	
		Suspension et Phénothiazine bromée irradiées ensemble	2 min.	-59	PS = 3
Phénothiazine bromée	15×10^{-5}	Suspension et Phénothiazine bromée non irradiée	0	-39	
		Suspension et Phénothiazine bromée irradiée seule	2 min.	-39	PM = 0
Chlorpromazine	$7,5 \times 10^{-5}$	Suspension bactérienne irradiée	2 min.	-46	
		Suspension et Chlorpromazine non irradiée	0	+4	
		Suspension et Chlorpromazine irradiées ensemble	2 min.	-98	PS = 56

Tableau I. (suite)

Molécule étudiée	Concentration	Conditions expérimentales	Irradiation minutes	Effet %	Propriété PS ou PM
Chlorpromazine	$7,5 \times 10^{-5}$	Suspension et Chlorpromazine non irradiée	0	+9	PM =
		Suspension et Chlorpromazine irradiée seule -avec filtre de Wood.	2 min.	0	en lumière de Wood= 0
		Suspension et Chlorpromazine irradiée seule -sans filtre	2 min.	-66	en lumière normale=75
Chlorpromazine	15×10^{-5}	Suspension et Chlorpromazine non irradiée	0	-29	
		Suspension et Chlorpromazine irradiée seule	2 min.	-97	PM = 68
Prométhazine (Phénergan)	15×10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	2 min.	-70	
		Suspension et Prométhazine non irradiée	0	-24	
		Suspension et Prométhazine irradiées ensemble	2 min.	-95	PS = 1
Alimémazine (Théralène)	5×10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-26	
		Suspension et Alimémazine non irradiée	0	+6	
		Suspension et Alimémazine irradiées ensemble	1 min.	-36	PS = 16
Alimémazine (Théralène)	5×10^{-5}	Suspension et Alimémazine non irradiée	0 min.	-3	
		Suspension et Alimémazine irradiée seule	1 min.	-10	PM = 7

Molécule étudiée	Concentration	Conditions expérimentales	Irradiation minutes	Effet %	Propriété PS ou PM
Lévomépromazine (Nozinan)	5×10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-31	
		Suspension et Lévomépromazine non irradiée	0	+7	
		Suspension et Lévomépromazine irradiées ensemble	1 min.	-37	PS = 13
Prochlorpémazine (Témentil)	2×10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-29	
		Suspension et Prochlorpémazine non irradiée	0	0	
		Suspension et Prochlorpémazine irradiées ensemble	1 min.	-44	PS = 15
Prochlorpémazine (Témentil	$3,5 \times 10^{-5}$	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-32	
		Suspension et Prochlorpémazine non irradiée.	0 min.	-6	
		Suspension et Prochlorpémazine irradiées ensemble	1 min.	-93	PS = 55
Prochlorpémazine (Témentil)	$3,5 \times 10^{-5}$	Suspension et Prochlorpémazine non irradiée	0 min.	-7	
		Suspension et Prochlorpémazine irradiée seule	1 min.	-14	PM = 7

Molécule étudiée	Concentration	Conditions expérimentales	Irradiation minutes	Effet %	Propriété PS ou PM
Méthopromazine (Mopazine)	10×10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-60	
		Suspension et Méthopromazine non irradiée	0	-21	
		Suspension et Méthopromazine irradiées ensemble	1 min.	-60	Aucun effet PS.
Thionine	15×10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	2 min.	-60	
		Suspension et Thionine non irradiée	0	-29	
		Suspension et Thionine irradiées ensemble	2 min.	-85	Aucun effet PS.
Thionine	15×10^{-5}	Suspension et Thionine non irradiée	0	-15	
		Suspension et Thionine irradiée seule	2	-19	PM = 4
Bleu de méthylène	5×10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-33	
		Suspension et Bleu de méthylène sans irradiation	0	+16	
		Suspension et Bleu de méthylène irradiés ensemble	1 min.	-21	PS = 4

Sensibilité des cellules du sarcome ascitique d'Ehrlich à la chlorpromazine.

La présence dans le laboratoire de Monsieur le Professeur CARRAZ, tandis que nous conduisions nos travaux sur le Bacillus subtilis, de cellules du sarcome ascitique d'Ehrlich entrenu sur souris Swiss, nous a incité à mesurer les modifications apportées à leur consommation d'oxygène par une solution de chlorpromazine à 20. 10^{-5} dans le liquide de KREBS-RINGER.

La suspension cellulaire est obtenue par ponction, huit jours après la cancérisation de la souris. Le liquide d'ascite ayant été centrifugé, les cellules sont lavées dans la solution de KREBS-RINGER et remises en suspension dans ce liquide, de façon à obtenir un poids de 200 milligrammes de cellules fraîches dans 1,25 millilitre de suspension. Une dilution, semblable à celle faite dans le cas de la suspension bactérienne, nous permet de faire les mesures à l'appareil de Warburg sur 2,5 millilitres de suspension contenant le liquide à tester.

Nous présentons, dans le tableau suivant (II.A) les modifications apportées à la consommation d'oxygène par la solution de chlorpromazine irradiée par une lampe à vapeur de mercure, en présence ou en l'absence de la suspension cellulaire.

Effet de la chlorpromazine irradiée par des rayons X, sur une suspension de B.subtilis ou de cellule d'Ehrlich.

Sans quitter le domaine des radiations électromagnétiques, nous avons abordé l'étude des effets produits sur la consommation d'oxygène d'une cellule cible par la molécule de chlorpromazine irradiée seule par des rayons X.

Les irradiations sont faites au moyen d'un appareil Philips de cyclothérapie à feu nu. Des boites de Pétri de 7

7 centimètres de diamètre, contenant 10 millilitres de solution de chlorpromazine à 4. 10^{-4}, placées à 26,5 centimètres de la source, reçoivent des irradiations de 50.000 et 100.000 roentgens (r.). Ces valeurs sont contrôlées par un dosimètre placé sous les boites.

Ces solutions sont ensuite mélangées par parties égales à la suspension bactérienne, puis la technique de mesure se poursuit comme précédemment (tableau II.C).

Nous avons par ailleurs, mesuré les effets produits par une solution de chlorpromazine à 3. 10^{-4} dans la solution de KREBS-RINGER et irradiée par des rayons X (1000 r.) suivant la technique précédente, sur la consommation d'oxygène d'une suspension de cellules d'Ehrlich. La solution a été irradiée en présence ou en l'absence de cette suspension (tableau II.B).

Tableau II A.

EFFET DE LA CHLORPROMAZINE SUR LES CELLULES D'EHRLICH
IRRADIATION PAR LAMPE A VAPEUR DE MERCURE

Molécule étudiée	Concentration	Conditions Expérimentales	Irradiation	Effet %	Propriété PS ou PM
Chlorpromazine	$20.\ 10^{-5}$	Suspension cellulaire irradiée	2 min.	+1	
		Suspension et Chlorpromazine non irradiée	0	-44	
		Suspension et Chlorpromazine irradiées ensemble	2 min.	-54	PS. = 11
Chlorpromazine	$20.\ 10^{-5}$	Suspension et Chlorpromazine non irradiée	0	-31	
		Suspension et Chlorpromazine irradiée seule	2 min.	+2	Aucun effet PM
Chlorpromazine	$20.\ 10^{-5}$	Suspension et Chlorpromazine non irradiée	0	-18	
		Suspension et Chlorpromazine irradiée seule	5 min.	+6	Aucun effet PM
		Suspension et Chlorpromazine irradiée seule	10min.	-2	
Chlorpromazine	$15.\ 10^{-5}$	Suspension et Chlorpromazine non irradiée	0	-13	Aucun effet PM
		Suspension et Chlorpromazine irradiée seule	2 min.	+10	

Tableau II B.

EFFET DE LA CHLORPROMAZINE SUR LES CELLULES D'EHRLICH

IRRADIATION AUX RAYONS X DE 1.000r.

Molécule étudiée	Concentration	Conditions expérimentales	Irradiation	Effet %	Propriétés
Chlorpromazine	$15.\ 10^{-5}$	Suspension cellulaire irradiée	1.000r.	-4	
		Suspension et Chlorpromazine non irradiée	0	-39	
		Suspension et Chlorpromazine irradiées ensemble	R.X.	-58	Radiosensibilisation=19
Chlorpromazine	$15.\ 10^{-5}$	Suspension cellulaire irradiée	R.X.	-3	
		Suspension et Chlorpromazine non irradiée	0	-29	
		Suspension et Chlorpromazine irradiées	R.X.	-50	R.S. = 21
Chlorpromazine	$15.\ 10^{-5}$	Suspension et Chlorpromazine non irradiée	0	-54	
		Suspension et Chlorpromazine irradiée seule	R.X.	-69	Effet radiomimétique =15
Chlorpromazine	$15.\ 10^{-5}$	Suspension et Chlorpromazine non irradiée	0	-30	
		Suspension et Chlorpromazine irradiée seule	R.X.	-52	Effet R.M=22

Tableau II C.

EFFET DE LA CHLORPROMAZINE IRRADIEE PAR DES RAYONS X,

SUR LA SUSPENSION DE B. SUBTILIS

Molécule étudiée	Concentration	Conditions expérimentales	Irradiation	Effet %	Propriétés
Chlorpromazine	$20.\ 10^{-5}$	Suspension et Chlorpromazine non irradiée	0	-70	
		Suspension et Chlorpromazine irradiée seule	50.000r	-80	— PM =10
		Suspension et Chlorpromazine irradiée seule	100.000r	-90	— PM =20

Examen chromatographique sur papier d'une solution de chlorpromazine irradiée par une lampe à vapeur de mercure.

Un tel examen est entrepris afin de tenter l'analyse d'une solution aqueuse irradiée de chlorpromazine. Pour cela, une solution aqueuse à 1. 10^{-1} de chlorpromazine est irradiée pendant trente minutes par la lampe à vapeur de mercure. Le mélange marron obtenu est chromatographié sur papier en même temps qu'une solution témoin non irradiée de chlorpromazine, de même concentration.

Nous employons, pour analyser ces solutions, une chromatographie descendante sur bande de papier filtre Balston n°1. Le solvant, préparé une nuit à l'avance dans une ampoule à décantation, comprend :

butanol	80 ml
acide acétique	20 ml
eau	100 ml.

Nous plaçons la phase organique supérieure dans la rigole d'une cuve en verre et la phase aqueuse dans un cristallisoir au fond de cette cuve. La durée de la saturation est de 24 heures.

Les solutions de chlorpromazine sont déposées suivant un trait sur les bandes de papier que nous plaçons dans la cuve, en contact avec la phase organique et à l'obscurité. Après une migration de 5 heures, les chromatogrammes sont séchés à une douce chaleur puis examinés en lumière U.V. et en lumière du jour. Nous avons obtenu, pour une migration du solvant de 25 centimètres, les résultats suivants :

	Rf.	U.V.	Lumière visible
Chlorpromazine non irradiée	0,40 - 0,44	Fluor.grise (faible)	
	0,56 - 0,84	bleu pâle	
Chlorpromazine irradiée	0,14 - 0,18	gris pâle	
	0,18 - 0,22	rose intense	rose intense
	0,22 - 0,48	gris pâle	
	0,48 - 0,60	roe pâle	rose pâle
	0,60 - 0,66	bleu pâle	bleu-vert pâle
	0,66 - 0,82	vert pâle	jaune pâle

Tentative de séparation, par chromatographie sur colonne d'alumine, des éléments d'une solution aqueuse de chlorpromazine irradiée.

- soit par une lampe à vapeur de mercure
- soit par des rayons X.

10 millilitres d'une solution aqueuse de chlorpromazine à 1. 10^{-1} sont irradiés pendant 30 minutes dans une boite de Pétri de 7 centimètres de diamètre par une lampe à vapeur de mercure.

D'autre part, 10 millilitres de cette même solution sont irradiés dans les conditions que nous avons décrites plus haut, par des rayons X (100.000 r.).

Les mélanges que nous obtenons dans ces solutions irradiées marrons sont, après évaporation, repris séparément par le benzène, puis sont fixés sur deux colonnes d'alumine Standard Merck de 0,8 centimètre de diamètre, en milieu benzénique. Plusieurs séries d'élutions par des solvants benzéniques de plus en plus riches en méthanol, ont donné, à partir de chacune des colonnes, six solutions de couleurs différentes. Successivement:

Incolore
Bleue
Incolore à fluorescence verte
Rose
Bleue à fluorescence bleutée
Verte à fluorescence jaunâtre.

Effets produits par les composés obtenus, sur la consommation d'oxygène d'une suspension cellulaire ou bactérienne.

Après évaporation des solvants, les résidus obtenus, mis en solution à 4. 10^{-4} dans le liquide de KREBS-RINGER, sont testés suivant notre technique personnelle par rapport à une

solution de même titre de chlorpromazine non irradiée,(concentration dans l'appareil de Warburg : 2.10^{-4}).

Nous mesurons ainsi :

-d'une part les effets des composés extraits de la solution irradiée par les rayons lumineux, sur la consommation d'oxygène d'une suspension de cellules d'Ehrlich (tableau III A.);

-d'autre part ceux produits par les molécules extraites de la solution irradiée par les rayons X, sur la suspension cellulaire (tableau III. B) ou sur la suspension bactérienne (tableau III.C).

Nous réunissons enfin, dans un dernier tableau (III.D) les résultats globaux obtenus dans ces trois séries de mesures.

EFFETS PRODUITS PAR LES FRACTIONS ISOLEES PAR CHROMATOGRAPHIE,
D'UNE SOLUTION DE CHLORPROMAZINE IRRADIEE 30 MINUTES
SUR UNE SUSPENSION DE CELLULES D' EHRLICH

§§§

Molécule étudiée	Concentration	Conditions expérimentales	Irradiation	Effet %	Propriétés (*)
Chlorpromazine	2.10^{-4}	Zone A 1° incolore et suspension	30 min.	+16	+16
	2.10^{-4}	Chlorpromazine non irradiée "	0	0	
	2.10^{-4}	Zone B 1° bleue "	30 min.	-39	-5
	2.10^{-4}	Chlorpromazine non irradiée "	0	-34	
	2.10^{-4}	Zone C 2° incolore "	30 min.	-9	+25
	2.10^{-4}	Chlorpromazine non irradiée "	0	-34	
	2.10^{-4}	Zone D rose "	30 min.	-23	0
	2.10^{-4}	Chlorpromazine non irradiée "	0	-23	
	2.10^{-4}	Zone E 2° bleue "	30 min.	-4	+23
	2.10^{-4}	Chlorpromazine non irradiée "	0	-27	
	2.10^{-4}	Zone F verte "	30 min.	-38	-14
	2.10^{-4}	Chlorpromazine non irradiée "	0	-24	

(*) Remarque - Tableau III A. B. C. et D.
Chaque chiffre représente,en pourcentage, la modification de la respiration cellulaire, produite par une zone d' élution, par rapport à la respiration de la suspension cellulaire témoin, et après déduction de l'effet propre au largactil témoin (non irradié)employé à la même concentration.
- Les signes + et - indiquent le sens de cette modification:augmentation et diminution.

Tableau III. B

EFFETS PRODUITS PAR LES FRACTIONS ISOLEES PAR CHROMATOGRAPHIE

D'UNE SOLUTION DE CHLORPROMAZINE IRRADIEE AUX RAYONS X (100. 000 r.)

SUR UNE SUSPENSION DE CELLULES D'EHRLICH

Molécule étudiée	Concentration	Conditions expérimentales	Irradiation	Effet %	Propriétés (*) p.39
Chlorpromazine	$2.\ 10^{-4}$	Zone A. 1° incolore et suspension	R.X.	-12	
	$2.\ 10^{-4}$	Chlorpromazine non irradiée "	0	-50	+38
	$2.\ 10^{-4}$	Zone B. 1° bleue "	R.X.	-65	-5
	$2.\ 10^{-4}$	Chlorpromazine non irradiée "	0	-50	
	$2.\ 10^{-4}$	Zone C. 2° incolore "	R.X.	-50	+10
	$2.\ 10^{-4}$	Chlorpromazine non irradiée "	0	-60	
	$2.\ 10^{-4}$	Zone D. rose "	R.X.	-70	-20
	$2.\ 10^{-4}$	Chlorpromazine non irradiée "	0	-50	
	$2.\ 10^{-4}$	Zone E. 2° bleue "	R.X.	-6	+44
	$2.\ 10^{-4}$	Chlorpromazine non irradiée "	0	-50	
	$2.\ 10^{-4}$	Zone F. verte "	R.X.	-59	-9
	$2.\ 10^{-4}$	Chlorpromazine non irradiée et "	0	-50	

Tableau III. C

EFFETS PRODUITS PAR LES FRACTIONS ISOLEES PAR CHROMATOGRAPHIE D'UNE SOLUTION DE CHLORPROMAZINE A 1.10^{-1} IRRADIEE 100.000 r. SUR UNE SUSPENSION DE BACILLUS SUBTILIS

Molécule étudiée	Concentration	Conditions expérimentales	Irradiation	Effet %	Propriétés (*) p.39
Chlorpromazine	20×10^{-5}	Zone A. 1° incolore	R.X.	-48	
	20×10^{-5}	Chlorpromazine non irradiée et suspension	0	-87	+ 39
	20×10^{-5}	Zone B. 1° bleue	R.X.	-93	
	20×10^{-5}	Chlorpromazine non irradiée et suspension	0	-87	- 6
	20×10^{-5}	Zone C. 2° incolore	R.X.	-85	
	20×10^{-5}	Chlorpromazine non irradiée et suspension	0	-83	- 2
	$20+ 10^{-5}$	Zone D. Rose	R.X.	-93	
	20×10^{-5}	Chlorpromazine non irradiée et suspension	0	-64	-29
	20×10^{-5}	Zone E. 2° bleue	R.X.	-98	
	20×10^{-5}	Chlorpromazine non irradiée et suspension	0	-83	-15
	20×10^{-5}	Zone F. verte	R.X.	-93	
	20×10^{-5}	Chlorpromazine non irradiée et suspension	0	-68	-25

Tableau III.D

RESULTATS GLOBAUX OBTENUS DANS LES TROIS PRECEDENTES SERIES DE MESURES

	Irradiation U.V. 30 minutes	Irradiations X. 100.000 r.	
	Cellules d'Ehrlich	Cellules d'Ehrlich	B. subtilis
Zone incolore	+ 16	+ 38	+ 39
Zone bleue	- 5	- 5	- 5
Zone incolore	+ 25	+ 10	- 2
Zone rose	0	- 20	- 29
Zone bleue	+ 23	+ 44	- 15
Zone verte	- 14	- 9	- 25

Interprétation des résultats -voir la remarque (*) p.39.

P H E N O L S

RESORCINOL ou 1.3- Benzenediol.

Les trois propriétés qui en principe devaient se retrouver chez le photosensibilisant recherché, à savoir être réducteur, être incolore et être antiseptique, se trouvent chez le résorcinol dont on connaît par ailleurs depuis longtemps les propriétés photosensibilisantes légères mais nettes. Aussi avons-nous appliqué nos techniques de recherche à cette molécule pour obtenir les résultats présentés dans le tableau IV.

Ayant constaté l'abaissement très sensible de la consommation d'oxygène en présence de résorcinol irradié seul ou en présence de la suspension bactérienne, nous avons tenté un isolement chromatographique sur colonne d'alumine, suivant une technique que nous décrivons plus loin, des éléments d'une solution irradiée de ce diphénol, avant de mesurer leurs propriétés photomimétiques. (Tableau IV)

Etude par chromatographie de partage d'une solution de résorcinol irradié.

4 millilitres d'une solution aqueuse de résorcinol à $4. 10^{-3}$ sont irradiés pendant 15 minutes sans filtre de Wood dans une boite de Pétri de 8 centimètres de diamètre.

La solution rose obtenue est reprise dans une ampoule à décantation par 15 millilitres d'un solvant éthéro-benzénique, (éther 1 p. -benzène 4 p.). Cette solution est alors placée sur une colonne d'alumine Standard Merck de 0,8 centimètre de diamètre et de 19 centimètres de longueur, en milieu benzénique.

Après la fixation des composés en solution sur la colonne, quatre séries d'élutions sont faites avec les solvants suivants :

A Solution éthéro-benzénique + méthanol $1.\ 10^{-2}$

B " " + " $2.\ 10^{-2}$

C " " + " $5.\ 10^{-2}$

D Méthanol pur.

Seuls les éluants B et C ont donné, après évaporation des résidus dont les poids nous permettaient des mesures à l'appareil de Warburg. Les solutions ainsi testées avaient, après dilution par la suspension bactérienne, un titre de 2.10^{-3} semblable à celui des solutions testées de résorcinol (Tableau IV).

LES CARACTERES DES MESURES PRESENTEES DANS LES TABLEAUX QUI SUIVENT SONT RANGES EN SIX COLONNES VERTICALES :

1°) Dénomination commune de la molécule étudiée.

2°) Concentration de la solution de cette molécule en présence de la suspension bactérienne.

3°) Description des conditions expérimentales.

4°) "Irradiation" temps d'irradiation en minutes. Sauf indication contraire, les irradiations sont faites sans filtre.

5°) Variations, en pourcentage, de la consommation d'oxygène, par rapport à celle de la souche témoin : non traitée et non irradiée. Les signes + ou - indiquent si la variation a lieu dans le sens d'une augmentation de la consommation d'oxygène (= ou dans le sens d'une diminution (-).

6°) Propriétés de la molécule :

P.S. exprime le pouvoir photosensibilisant tel que nous l'avons défini précédemment.

P.M. représente le pouvoir photomimétique, c'est-à-dire l'activité de la molécule irrédiée sans irradiation de la bactérie.

Les chiffres indiquent la diminution de la consommation d'oxygène en pourcentage par rapport à la consommation du témoin.

Tableau IV.

R E S O R C I N O L

Molécule étudiée	Concentration	Conditions Expérimentales	Irradiation minutes	Effet %	Propriétés
Résorcinol	2×10^{-3}	Suspension bactérienne irradiée	2 min.	-35	
		Suspension et Résorcinol non irradié	0	-9	
		Suspension et Résorcinol irradiés ensemble	2 min.	-83	PS = 39
Résorcinol	2×10^{-3}	Suspension bactérienne irradiée	2 min.	-42	
		Suspension et Résorcinol non irradié	0	-14	
		Suspension et Résorcinol irradiés ensemble	2 min.	-97	PS = 41
Résorcinol	2×10^{-3}	Suspension et Résorcinol non irradié	0	-8	
		Suspension et Résorcinol irradié seul	2 min.	-26	PM = 18
Résorcinol	2×10^{-3}	Suspension et Résorcinol non irradié	0	-11	
		Suspension et Résorcinol irradié seul mais avec filtre de Wood	2 min.	-11	PM = 0
		Suspension et Résorcinol irradié seul normalement	2 min.	-40	PM = 29
Résorcinol	2×10^{-3}	Suspension et Résorcinol non irradié	0	0	
		Suspension et Résorcinol irradié seul	15min.	-78	PM = 78
Résorcinol	2×10^{-3}	Suspension et Résorcinol non irradié	0	-4	
		Suspension et Résorcinol irradié seul , mais 24 heures avant le dosage	15 min.	-49	PM = 45

Tableau IV.(suite)

Molécule étudiée	Concentration	Conditions Expérimentales	Irradiation minutes	Effet %	Propriétés
Résorcinol	2×10^{-3}	Suspension et Résorcinol non irradié	0	0	
		Suspension et Résorcinol irradié seul	30 min.	-78	PM = 78
Résorcinol	2×10^{-3}	Suspension et Résorcinol non irradié	0	0	
		Suspension et Résorcinol irradié seul , mais la veille du dosage	30 min.	-50	PM = 50
Résorcinol	2×10^{-3}	Suspension et Résorcinol non irradié	0	-6	
		Suspension et Résorcinol irradié seule:			
		Eluat 2 % CH3OH (B)	15 min.	-66	PM = 60
		Eluat 5 % CH3OH (C)	15 min.	-73	PM = 67

DERIVES CHLORES DU PHENOL

Nous venons de voir que le résorcinol possède un pouvoir de photosensibilisation certain et un pouvoir photomimétique appréciable. Ces propriétés sont dues à la présence conjointe de deux oxhydryles phénoliques en méta sur le noyau. Nous allons en effet voir que le monophénol ne montre aucune de ces propriétés. Nous avons alors cherché à connaître l'effet produit par la présence de l'atome de chlore sur le noyau phénolique. La présence de cet halogène nous avait en effet semblé favorable lors de notre étude des dérivés phénothiaziniques (chlorpromazine et prochlorpémazine).

Les molécules que nous avons explorées sont les suivantes :

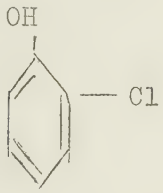
- phénol
- ortho chlorophénol
- para chlorophénol (nous n'avons pu disposer de méta chlorophénol).
- 2.4. dichlorophénol
- "2.4.D" acide 2.4. dichlorophénoxyacétique
- 2.4. dichlorophénoxyacétate de sodium
- 2.5. dichlorophénol
- 2.4.5. trichlorophénol
- 2.4.6. trichlorophénol
- 2.3.4.6. tetrachlorophénol
- penta chlorophénol
- méta aminophénol
- para nitrophénol
- para chloraniline.

Les résultats de nos mesures sont présentés, au terme de ce chapitre, dans le tableau V.

L'abaissement très important de la consommation d'oxygène, que nous avons noté en présence du para chlorophénol irradié seul ou en présence de la suspension bactérienne, nous a conduit à isoler par chromatographie sur colonne d'alumine, suivant une technique que nous décrivons plus loin, les éléments d'une solution irradiée de ce chlorophénol, avant de mesurer leurs propriétés photomimétiques.

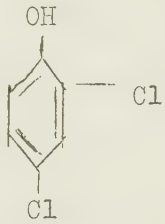
Nous avons, en outre, tenté de séparer ces derniers par chromatographie sur papier.

Dérivés chlorés du phénol.

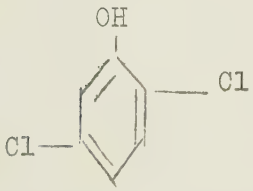


Ortho chlorophénol

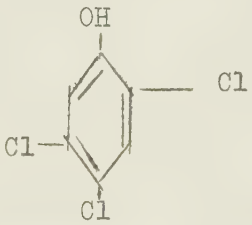
Para chlorophénol



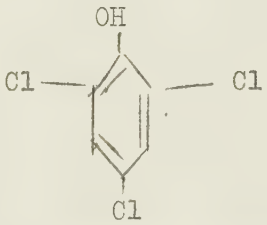
2.4. di chlorophénol



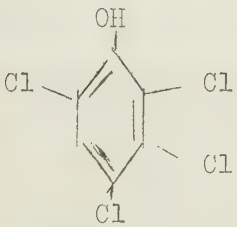
2.5. dichlorophénol



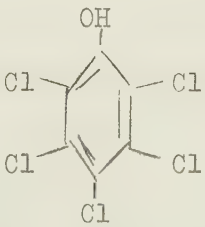
2.4.5.trichlorophénol



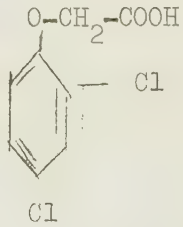
2.4.6.trichlorophénol



2.3.4.6. tétra chlorophénol



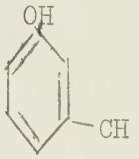
2.3.4.5.6. penta-chlorophénol



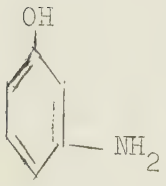
Acide "2.4.D" 2.4.dichlorophénoxyacétique

Phénols - Dérivés du phénol -Para chloraniline

Phénol



Résorcinol



Meta aminophénol

Para nitro phénol

Para chloro aniline

Séparation par chromatographie de partage des éléments d'une solution aqueuse de para chlorophénol irradié.

40 millilitres d'une solution aqueuse de para chlorophénol à 15×10^{-3} sont irradiés pendant cinq heures dans deux boites de Pétri de 15 centimètres de diamètre. Sur cette mince couche liquide et incolore, apparaît en moins d'une minute une pellicule brune formée de fines gouttelettes d'aspect huileux. Lorsque l'irradiation se prolonge, le volume d'eau diminue par évaporation tandis que se forment de larges gouttes brunes sombres. Nous avons ici maintenu l'irradiation pendant cinq heures ; les boites de Pétri ne contiennent plus alors qu'un résidu huileux marron et un goudron plus foncé encore.

Ce résidu, solubilisé dans 10 millilitres d'une solution éthéro-chloroformique (éther 1p. -chloroforme 3p.), est fixé sur une colonne d'alumine Standard Merck, de 0,8 centimètre

de diamètre et de 23 centimètres de long, en milieu benzénique. Dès cette fixation, deux zones de couleurs différentes apparaissent sur la colonne : l'une supérieure, marron et large de 2 centimètres, l'autre violette et de même largeur.

Une première série d'élutions est faite par des solutions éthéro-chloroformiques de plus en plus riches en éther, sans que nous parvenions à extraire l'un des composants du mélange fixé. Suivant l'échelle de ces dilutions, nous parvenons vite à un arrangement stable qui apparaît, en lumière normale et en lumière de Wood, de la façon suivante, du haut en bas :

zone marron	hauteur de 3 cm.
zone grise	" " 3 cm.
zone violette	" " 4 cm.
anneau violet foncé	" " 1 cm.
zone fluorescente verte	" " 2 cm.

(éther 14p. chloroforme 6p.)

Dans une deuxième série d'élutions, le solvant est un mélange de chloroforme et d'alcool méthylique :

Eluant A	chloroforme	19 ml.
	alcool méthylique	1 ml.

Il modifie l'aspect et la position de certaines couches colorées dans la colonne. Tandis que ce solvant progresse dans l'alumine, la large zone violette et l'anneau sombre sont désorganisés et repoussés plus bas ; 60 millilitres de l'éluat brun-rouge vif donnent, après évaporation du solvant, 9,5mg. d'un résidu ayant l'aspect d'une laque marron rouge. Sur la colonne apparaît un nouvel arrangement des zones colorées, tandis que la zone fluorescente n'est plus visible; soit, du haut en bas :

zone marron	hauteur de 4 cm.
zone grise - rose	hauteur de 6 cm.
anneau violet foncé	hauteur de 1 cm.
zone grise - rose	" " 5 cm.
zone violette	" " 4 cm.
zone violette pâle	jusqu'en bas.

Eluant B chloroforme 18 ml.
alcool méthylique 2 ml.

Il entraîne la large bande violette : 20 millilitres d'éluat jaune laissent, après évaporation du solvant 5,1 milligrammes d'un corps cristallisé en étoiles brunes claires imbriquées les unes dans les autres, en écailles de poisson.

Eluant C chloroforme 15 ml.
alcool méthylique 5 ml.
puis alcool méthylique pur.

20 millilitres de chacun de ces solvants n'apportèrent pas de modification à l'aspect de la colonne. Le résidu obtenu est constitué par ces mêmes cristaux et par un dépôt amorphe brun.

Les mélanges extraits par chacune de ces élutions ont été testés à l'appareil de Warburg. Ils diminuent très nettement la respiration des bactéries en suspension, comme le montre ci-après les résultats obtenus (tableau V).

Examen chromatographique sur papier d'une solution de p.chlorophénol irradiée

Une solution aqueuse à 1.10^{-2} de para chlorophénol est irradiée pendant 30 minutes. Le mélange obtenu est chromatographié sur papier en même temps qu'une solution témoin, non irradiée et de même concentration.

Nous employons, pour analyser ces solutions, une chromatographie descendante sur bande de papier filtre(*).Le solvant, préparé une nuit à l'avance dans une ampoule à décantation, comprend :

butanol	80 ml
acide acétique	20 ml
eau	100 ml.

Nous plaçons la phase organique supérieure dans la rigole de verre et la phase aqueuse dans un cristallisoir au fond de la cuve. La durée de la saturation est de 24 heures.

Les solutions de p. chlorophénol sont déposées suivant un trait sur les bandes de papier que nous plaçons dans la cuve, en contact avec la phase organique et à l'obscurité. Après une migration de 5 heures, les chromatogrammes sont séchés à une douce chaleur, puis examinés en lumière U.V. et en lumière du jour. Nous obtenons, pour une migration du solvant de 23 centimètres, les résultats suivants :

	Rf.	U.V.	Visible
p. chlorophénol	0,95 - 1,00	gris pâle	
p. chlorophénol irradié	0,45	gris pâle	
	0,80 - 0,98	marron-rouge	marron pâle
	0,98 - 1,00	gris pâle	

(*) Papier filtre Balston n°1.

DERIVES CHLORES DU PHENOL

Molécule étudiée	Concentration	Conditions expérimentales	Irradiation	Effet %	Propriétés (*)
Phénol	$1.\ 10^{-4}$	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-23	
		Suspension et Phénol non irradié	0	0	
		Suspension et Phénol irradiés ensemble	1 min.	-23	P.S. = 0
Orthochlorophénol	$1.\ 10^{-4}$	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-16	
		Suspension et Orthochlorophénol non irradié	0	-12	
		Suspension et Orthochlorophénol irradiés ensemble	1 min.	-28	P.S. = 0
Parachlorophénol	$1.\ 10^{-4}$	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-15	
		Suspension et Parachlorophénol non irradié	0	0	
		Suspension et Parachlorophénol irradiés ensemble	1 min.	-100	P.S. = 85
Parachlorophénol	$2.\ 10^{-5}$	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-35	
		Suspension et Parachlorophénol non irradié	0	-9	
		Suspension et Parachlorophénol irradiés ensemble	1 min.	-78	P.S. = 34

(*) Lecture du tableau cf. page 44 bis

Tableau V. (suite)

Molécule étudiée	Concentration	Conditions expérimentales	Irradiation	Effet %	Propriétés
Parachlorophénol	1.10^{-4}	Suspension et Parachlorophénol non irradié	0	0	
		Suspension et Parachlorophénol irradié seul	1 min.	-92	P.M. = 92
Parachlorophénol	1.10^{-4}	Suspension et Parachlorophénol non irradié	0	0	
		Suspension et Parachlorophénol irradié seul	1 min.	-98	P.M. = 98
Parachlorophénol	1.10^{-4}	Suspension et Parachlorophénol non irradié	0	-8	
		Suspension et Parachlorophénol irradié seul	1 min.	-97	P.M. = 89
Parachlorophénol Eluat A	1.10^{-4}	Suspension et Parachlorophénol non irradié	0	0	
		Suspension et Eluat A. irradié seul avant la chromatographie	5 h.	-49	P.M. = 49
Eluat B	1.10^{-4}	Suspension et Parachlorophénol non irradié	0	0	
		Suspension et Eluat B. irradié seul avant la chromatographie	5 h.	-86	P.M. = 86
Eluat C.	1.10^{-4}	Suspension et Parachlorophénol non irradié	0	-8	
		Suspension et Eluat C. irradié seul avant la chromatographie	5 h.	-97	P.M. = 89

Molécule étudiée	Concentration	Conditions expérimentales	Irradiation	Effet %	Propriétés
2.4.dichlorophénol	2.10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-22	
		Suspension et 2.4.dichlorophénol non irradié	0	+26	
		Suspension et 2.4.dichlorophénol irradiée ensemble	1 min.	-32	P.S. = 16
Acide "2.4.D"	2.10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-18	
		Suspension et Acide "2.4.D" non irradié	0	+1	
		Suspension et Acide "2.4.D" irradiés ensemble	1 min.	-30	P.S. = 13
Acide "2.4.D"	2.10^{-5}	Suspension et Acide "2.4.D" non irradié	0	+2	
		Suspension et Acide "2.4.D" irradié seul	1 min.	-1	P.M. = 3
		Suspension et Acide "2.4.D" irradié seul	15min.	-5	P.M. = 7
Sel "2.4.D" Na	2.10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-26	
		Suspension et Sel"2.4.D" Na non irradié	0	+1	
		Suspension et Sel"2.4.D" Na irradiés ensemble	1 min.	-34	P.S. = 9
2.5.dichlorophénol	2.10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-22	
		Suspension et 2.5.dichlorophénol non irradié	0	+33	
		Suspension et 2.5.dichlorophénol irradiés ensemble	1 min.	-41	P.S. = 52

Tableau V. (suite)

Molécule étudiée	Concentration	Conditions expérimentales	Irradiation	Effet %	Propriétés
2.5.dichlorophénol	2.10^{-5}	Suspension et 2.5.dichlorophénol non irradié	0	+ 14	
		Suspension et 2.5.dichlorophénol irradié seul	1 min.	- 8	P.M. = 22
		Suspension et 2.5.dichlorophénol irradié seul	15min.	-10	P.M. = 24
2.4.5.trichlorophénol	2.10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	- 28	
		Suspension et 2.4.5.trichlorophénol non irradié	0	- 91	
		Suspension et 2.4.5.trichlorophénol irradiés ensemble	1 min.	- 91	trop concentré
2.4.5.trichlorophénol	2.10^{-6}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	- 22	
		Suspension et 2.4.5.trichlorophénol non irradié	0	+ 6	
		Suspension et 2.4.5.trichlorophénol irradiés ensemble	1 min.	- 21	P.S. = 5
2.4.6.trichlorophénol	2.10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	- 25	
		Suspension et 2.4.6.trichlorophénol non irradié	0	- 7	
		Suspension et 2.4.6.trichlorophénol irradiés ensemble	1 min.	-45	P.S. = 13
2.3.4.6.tétrachlorophénol	2.10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-26	
		Suspension et 2.3.4.6.tétrachlorophénol non irradiée	0	-46	
		Suspension et 2.3.4.6.tétrachlorophénol irradiés ensemble	1 min.	-90	P.S. = 18

Tableau V. (suite)

Molécule étudiée	Concentration	Conditions expérimentales	Irradiation	Effet %	Propriétés
Pentachlorophénol	2.10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-12	
		Suspension et Pentachlorophénol non irradié	0	-52	
		Suspension et Pentachlorophénol irradiés ensemble	1 min.	-80	P.S. = 16
Métaaminophénol	2.10^{-3}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-19	
		Suspension et Métaaminophénol non irradié	0	-9	
		Suspension et Métaaminophénol irradiés ensemble	1 min.	-34	P.S. = 6
Paranitrophénol	5.10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-27	
		Suspension et Paranitrophénol non irradié	0	-8	Aucun effet P.S.
		Suspension et Paranitrophénol irradiés ensemble	1 min.	-27	
Parachloraniline	5.10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-25	
		Suspension et Parachloraniline non irradiée	0	-5	
		Suspension et Parachloraniline irradiéss ensemble	1 min.	-50	P.S.= 20
Parachloraniline	5.10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-29	
		Suspension et Parachloraniline non irradiée	0	0	
		Suspension et Parachloraniline irradiéss ensemble	1 min.	-47	P.S. = 18
Parachloraniline	5.10^{-5}	Suspension et Parachloraniline non irradiée	0	0	
		Suspension et Parachloraniline irradiée seule	15min.	-14	P.M. = 14

DERIVES DU TRIPHENYL METHANE

Parmi plusieurs dérivés du triphényl méthane dont l'action photosensibilisante est signalée, nous avons retenu l'éosine, l'érythrosine, le rose bengale, le violet de méthyle et la fluorescéine.

L'action de l'éosine, dont l'emploi en thérapeutique est à l'origine de nos travaux, a été souvent mise en évidence. KYO en 1939 (24) mesure son influence sur l'épaisseur du pigment rétinien. DAVID en 1941 (11) montre l'intense action inhibitrice de ce produit sur la pousse des radicelles, par photosensibilisation. En 1945, URBANI (34) en montre l'effet toxique pour une suspension de paracémies, en présence de lumière solaire,suivant une technique que nous avons citée plus haut. Plus près de nous, HELME (21) observe en 1945, la sensibilisation de bactéries Coli B. aux rayons U.V. courts. Il est intéressant pour nous de noter que FOWLKS, en 1955 (17), constate que, testés par sa méthode de diffusion à partir d'un disque de papier, l'éosine et le bleu de méthylène se montrent inactifs sur divers dérivés Gram+ ou Gram-.

Nous trouvons moins souvent décrite l'action de l'érythrosine, homologue tétra-iodé de l'éosine. KYO (24) expérimente son action ainsi que celle du violet de méthyle comme il le fit pour celle de l'éosine. FIALA S. (15) montre en 1945 son action photodynamique sur les protéines, avant que RUBINSTEIN et Coll. (30) mesurent, en 1951, cette même action sur les protéines des muscles contractiles. Plus près de nous enfin, SANTAMARIA L. et Coll. (31) étudient son effet photodynamique sur les protéines sériques.

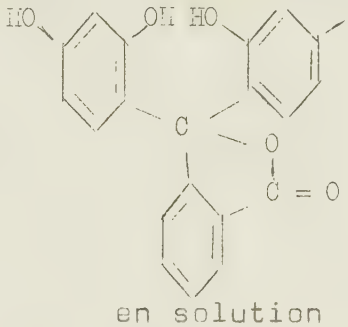
La formule chimique du rose bengale, tétraiodo-tétrachloro-fluorescéine, laissait supposer l'existence de propriétés photosensibilisantes que nous trouvons mentionnées dans plusieurs études des réactions d'hémolyse photodynamique : REGGIANINI O. en 1942 (28) et en 1948 (29), et BLUM H. et KAUTZMANN E. en 1954 (3). Par ailleurs, FREEMAN P. et GIESE A. (18) analysent en 1952 les effets photodynamiques produits par cette molécule sur les métabolismes et la reproduction de levures.

Nous retrouvons plusieurs de ces auteurs en abordant la fluorescéine et ses propriétés photosensibilisantes : FIALA S. (15) et SANTAMARIA L. (31). Par ailleurs, CALCUTT F. (5) en 1951, utilise son action sur les paracémies pour étudier le rôle des radiations dans l'action photodynamique.

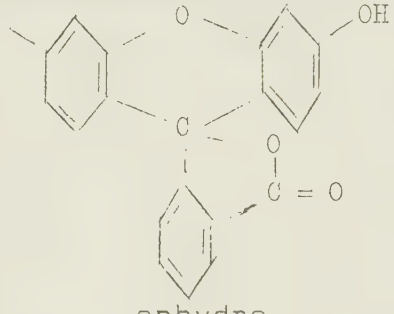
Etant donnée l'importance de l'action photodynamique de ces dérivés, et de l'éosine en particulier, nous avons été amenés à examiner, par la technique personnelle décrite, leurs propriétés photosensibilisantes et éventuellement photomimétiques.

Formules développées des dérivés du triphényl-méthane :

Fluorescéine

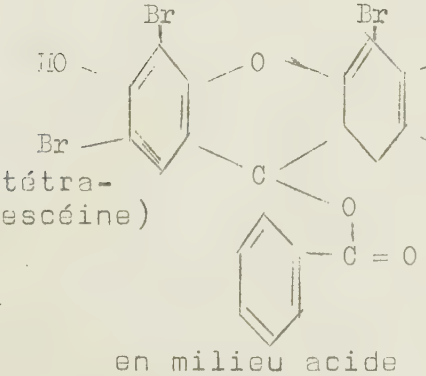


en solution

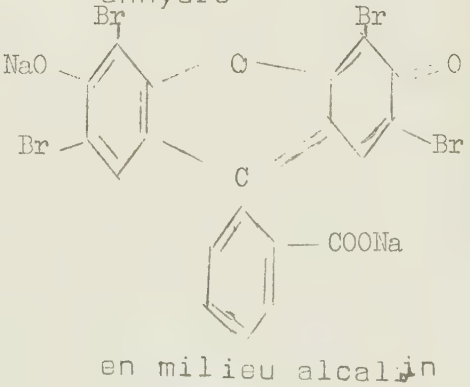


anhydre

Eosine (2457 tétra-bromo-fluorescéine)



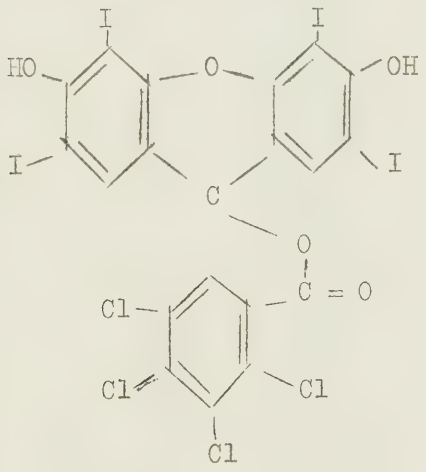
en milieu acide



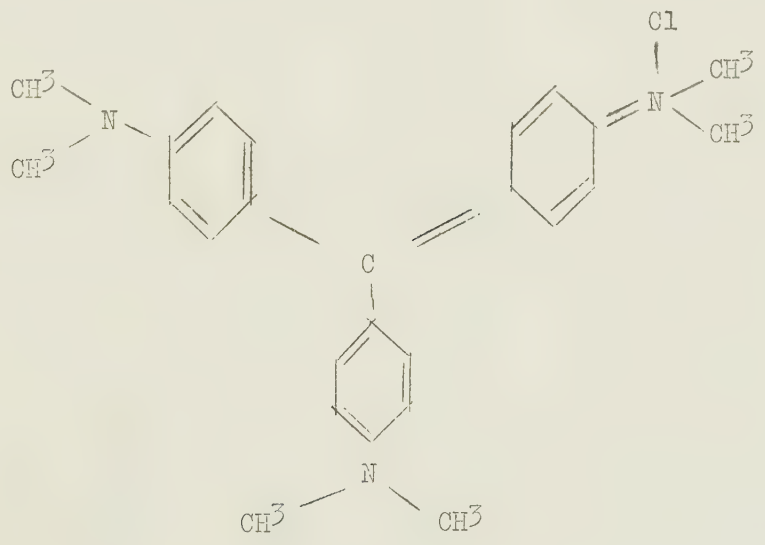
en milieu alcalin

Erythrosine ou Iodéosine (2457 tétraiodo fluorescéine).
Formule analogue à celle de l'éosine, dans laquelle 4 atomes d'iode remplacent les 4 atomes de brome.

Rose bengale - tétraiodo 2457 tétrachloro-fluorescéine.



Violet de méthyle



LES CARACTERES DES MESURES PRESENTEES DANS LES TABLEAUX QUI SUIVENT SONT RANGES EN SIX COLONNES VERTICALES :

1°) Dénomination commune de la molécule étudiée.

2°) Concentration de la solution de cette molécule en présence de la suspension bactérienne.

3°) Description des conditions expérimentales.

4°) "Irradiation" temps d'irradiation en minutes. Sauf indication contraire, les irradiations sont faites sans filtre.

5°) Variations, en pourcentage, de la consommation d'oxygène, par rapport à celle de la souche témoin : non traitée et non irradiée. Les signes + ou - indiquent si la variation a lieu dans le sens d'une augmentation de la consommation d'oxygène (= ou dans le sens d'une diminution (-).

6°) Propriétés de la molécule :

P.S. exprime le pouvoir photosensibilisant tel que nous l'avons défini précédemment.

P.M. représente le pouvoir photomimétique, c'est-à-dire l'activité de la molécule irrédiée sans irradiation de la bactérie.

Les chiffres indiquent la diminution de la consommation d'oxygène en pourcentage par rapport à la consommation du témoin.

DERIVES DU TRIPHENYLMETHANE

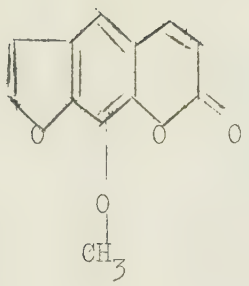
Molécule étudiée	Concentration	Conditions expérimentales	Irradiation	Effet %	Propriétés
Eosine	2.10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-46	
		Suspension et Eosine non irradiée	0	-17	
		Suspension et Eosine irradiées ensemble	1 min.	-94	P.S.=31
Eosine	2.10^{-5}	Suspension et Eosine non irradiée	0	-10	
		Suspension et Eosine irradiée seule	1 min.	-37	——PM = 27
		Suspension et Eosine irradiée seule	15min.	-31	——PM = 21
Erythrosine	2.10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-26	
		Suspension et Erythrosine non irradiée	0	-21	
		Suspension et Erythrosine irradiées ensemble	1 min.	-88	P.S.=47
Erythrosine	2.10^{-5}	Suspension et Erythrosine non irradiée	0	-26	
		Suspension et Erythrosine irradiée seule	1 min.	-80	——PM = 54
		Suspension et Erythrosine irradiée seule	15min.	-83	——PM = 57
Rose bengale	2.10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-32	
		Suspension et Rose bengale non irradié	0	-74	Trop concentré
		Suspension et Rose bengale irradiés ensemble	1 min.	-97	
Rose bengale	2.10^{-6}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-44	
		Suspension et Rose bengale non irradié	0	-8	
		Suspension et Rose bengale irradiés ensemble	1 min.	-84	P.S.=32

Molécule étudiée	Concentration	Conditions expérimentales	Irradiation	Effet %	Propriétés
Rose bengale	2.10^{-6}	Suspension et Rose bengale non irradié	0	-6	
		Suspension et Rose bengale irradié seul	1 min.	-20	
		Suspension et Rose bengale irradié seul	15min.	-20	——PM = 14
Violet de méthyle	5.10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-26	
		Suspension et Violet de méthyle non irradié	0	-54	
		Suspension et Violet de méthyle irradiés ensemble	1 min.	-96	P.S.=16
Violet de méthyle	5.10^{-5}	Suspension et Violet de méthyle non irradié	0	-60	
		Suspension et Violet de méthyle irradié seul	1 min.	-65	——PM = 5
		Suspension et Violet de méthyle irradié seul	15min.	-65	——PM = 5
Fluorescéine	5.10^{-5}	Suspension bactérienne irradiée	1 min.	-25	
		Suspension et Fluorescéine non irradiée	0	-22	
		Suspension et Fluorescéine irradiées ensemble	1 min.	-50	P.S.=3

X A N T H O T O X I N E

Depuis que FAHMY et ABU-SHADY (13) ont isolé, en 1947, la xanthotoxine ou 8-méthoxypsoralène à l'état cristallisé et en ont commencé l'étude pharmacodynamique, de nombreux auteurs se sont attachés à approfondir la connaissance que nous avons des propriétés photosensibilisantes de cette furocoumarine. En réalité, elle fut présente dans certains remèdes populaires de l'Inde et de l'Egypte pendant une trentaine de siècles. En France, SIDI et BOURGEOIS-GAVARDIN (33) l'employèrent en 1952, pour traiter des vitiligos et nous savons maintenant (FITZPATRICK et HOPKINS, 1955) (16), qu'administrée par voie orale, elle augmente la tolérance d'un vitiligo à la lumière solaire et augmente aussi sensiblement le tannage d'une peau normale, en la protégeant des brûlures solaires. D'autre part, MUSAJO en 1954 (26), a démontré qu'appliquée sur la peau humaine, la xanthotoxine donnait après irradiation par des rayons U.V. longs, une typique réaction d'érythème et d'oedème.

Le fait que la photosensibilisation de la peau par les psoralènes n'est pas particulière à l'homme, a été clairement montré par la sensibilité accrue de plusieurs espèces bactériennes aux U.V. longs en présence de ces composés (FOWLKS, GRIFFITH et OGINSKY, 1958) (17). En 1959, EVELYN et Coll. (12) ont recherché, suivant une technique que nous avons citée plus haut, l'action des variations des trois composants du système de photosensibilisation que représente l'irradiation d'une suspension bactérienne par des U.V. longs en présence de xanthotoxine.



Xanthotoxine ou 8-méthoxypsoralène

L'importance de l'action photodynamique de cette furocoumarine nous a amené à examiner, suivant notre technique de mesure, ses propriétés photosensibilisantes et éventuellement photomimétogènes.

La solution de xanthotoxine est préparée extemporanément en dissolvant 5 milligrammes de ce produit dans 0,5 millilitres d'acétone, puis, après avoir été diluée avec 100 millilitres de solution de KREBS-RINGER, cette solution est chauffée à l'ébullition et ramenée à la température de la pièce, et au volume initial par addition d'eau. Comme pour les autres produits étudiés, deux volumes égaux de suspension bactérienne et de cette solution sont mélangés au début de l'expérience, donnant une concentration finale de 25 microgrammes par millilitres. Pour la mesure de la consommation d'oxygène de la suspension bactérienne seule, la solution ajoutée à la suspension ne diffère de la précédente que par l'absence de xanthotoxine.

Les résultats fournis par nos mesures sont les suivants: (tableau VII).

LES CARACTERES DES MESURES PRESENTEES DANS LES TABLEAUX QUI SUIVENT SONT RANGES EN SIX COLONNES VERTICALES :

1°) Dénomination commune de la molécule étudiée.

2°) Concentration de la solution de cette molécule en présence de la suspension bactérienne.

3°) Description des conditions expérimentales.

4°) "Irradiation" temps d'irradiation en minutes. Sauf indication contraire, les irradiations sont faites sans filtre.

5°) Variations, en pourcentage, de la consommation d'oxygène, par rapport à celle de la souche témoin : non traitée et non irradiée. Les signes + ou - indiquent si la variation a lieu dans le sens d'une augmentation de la consommation d'oxygène (= ou dans le sens d'une diminution (-).

6°) Propriétés de la molécule :

P.S. exprime le pouvoir photosensibilisant tel que nous l'avons défini précédemment.

P.M. représente le pouvoir photomimétique, c'est-à-dire l'activité de la molécule irrédiée sans irradiation de la bactérie.

Les chiffres indiquent la diminution de la consommation d'oxygène en pourcentage par rapport à la consommation du témoin.

Tableau VII.

X A N T H O T O X I N E

Molécule étudiée	Concentration	Conditions expérimentales	Irradiation	Effet %	Propriétés
Xanthotoxine	25.10^{-6}	Suspension bactérienne irradiée	2 min.	-8	
		Suspension et Xanthotoxine non irradiée	0	-12	
		Suspension et Xanthotoxine irradiées ensemble	2 min.	-24	P.S. = 4
Xanthotoxine	25.10^{-6}	Suspension bactérienne irradiée	2 min.	-44	
		Suspension et Xanthotoxine non irradiée	0	0	
		Suspension et Xanthotoxine irradiées ensemble	2 min.	-48	P.S. = 4
Xanthotoxine	25.10^{-6}	Suspension et Xanthotoxine non irradiée	0	0	
		Suspension et Xanthotoxine irradiée seule	2 min.	0	P.M. = 0
Xanthotoxine	25.10^{-6}	Suspension et Xanthotoxine non irradiée	0	-12	
		Suspension et Xanthotoxine irradiée seule	2 min.	-14	P.M. = 2

RESULTATS CLINIQUES

Il est évident que depuis le début de ce travail nous n'avons pas eu la possibilité d'une observation clinique suffisamment ample sur des sujets présentant un psoriasis, pour que nous puissions en tirer des conclusions valables. Toutefois, au fur et à mesure de nos investigations pharmacodynamiques, nous avons confié au service de Monsieur le Professeur Agrégé DUBOIS quelques-uns des produits qui avaient donné des résultats positifs au laboratoire. D'autre part, malgré l'absence de tels résultats dans notre étude de la Xanthotoxine, les propriétés récemment décrites de cette molécule nous ont poussé à en aborder l'étude clinique dans les limites de notre travail.

Ce sont les observations succintes relevées que nous présentons ici.

RESORCINOL

En solution à 4 % dans l'alcool à 60° (éthanol).

M. GRA. A.	55 ans	tolérance : bonne.
M. BO		résultats : médiocres.
M. BOU. M.	34 ans	tolérance : bonne
		résultats : bons (équivaut à l'éosine).
MmePAS. J.	26 ans	tolérance : bonne
		résultats : léger.
Mlle BAN D.	11 ans	tolérance : bonne
		résultats : voisins de ceux de l'éosine.

Une solution aqueuse à 10% est irradiée pendant une heure par la source lumineuse. Le résidu d'aspect huileux laissé dans la boite de Pétri par l'évaporation de l'eau est mis en solution à 4% dans l'alcool à 60° (éthanol).

Mlle MAD. M. 9 ans tolérance : bonne
résultats : assez nets, plus marqués qu'avec le Résorcinol simple.

Le Résorcinol est actuellement employé en solution à 4 % dans l'alcool à 60°(éthanol). Après badigeonnage, le malade est exposé aux U.V. Les résultats observés semblent aussi satisfaisants que ceux obtenus avec l'éosine, dans les mêmes conditions d'irradiation (10 minutes environ).

———§§———

PARA CHLOROPHENOL IRRADIE

Une solution aqueuse à 1% est irradiée en couche mince pendant 2 heures par la source lumineuse. Le résidu d'aspect huileux est repris par un mélange éthéro-chloroformique (1p.+7p.). Concentration finale : 1%.

M. LAH. Ch. 24 ans tolérance : bonne
résultats : bons (équivaut à la traumaticine avec U.V. sur le malade).

M. MATH. H. 33 ans tolérance : bonne
résultats : assez bons(inférieurs à l'éosine).

M. NIC J. 35 ans tolérance : bonne
résultats : bons au début(équivaut à l'éosine).

4/7 : "très amélioré à ce jour, tant par la solution irradiée que par l'éosine".

1/7 : "la solution irradiée paraît ne plus faire progresser l'amélioration".

M. AYO A. 56 ans tolérance : bonne
résultats : bons (équivaut à l'éosine, meilleure efficacité sur le prurit).

M. ROT. H. 18 ans tolérance : bonne
résultats : semblables au cas précédent.

XANTHOTOXINE

Solution de xanthotoxine : xanthotoxine 0,25 g.
alcool à 60° 230 ml.
acétone 20 ml.

En badigeonnage, suivi d'une irradiation U.V. semblable à celle employée dans un traitement à l'éosine.

M. LAH. Ch. 24 ans tolérance : bonne
résultats : médiocres.

M. MOR. J. 50 ans tolérance : bonne
résultats : médiocres.

Mlle JIM. C. 11 ans tolérance : bonne
résultats : négatifs.

Mme ZAF. D. 34 ans tolérance : bonne
résultats : médiocres.

Mlle	JOU. A.	16 ans	tolérance : mauvaise; réactions phlycténulaires.
M.	NIC. J.	35 ans	tolérance : bonne résultats : bons (équivaut à l'éosine).
Mme	MIN. Y.	31 ans	tolérance : douteuse.
M.	SOU. J.	50 ans	tolérance : bonne. résultats : n'a pas nettement augmenté l'amélioration par rapport au côté irradié sans xanthotoxine.
M.	SOU. S.	20 ans	tolérance : bonne résultats : douteux.
M.	SEG M.	64 ans	tolérance : bonne résultats : douteux.

DISCUSSION GENERALE

Nous envisageons ici la discussion
1°) de la technique d'étude que nous proposons,
2°) des résultats expérimentaux obtenus par cette technique.

La technique que nous avons élaborée peut revendiquer une assez grande précision, la rapidité de l'exécution et une bonne reproductibilité. Il est néanmoins évident qu'elle repose entièrement, à ce point de vue, sur la constance de l'émulsion bactérienne utilisée. Il est assez difficile de prouver les qualités que nous affirmons autrement que par une assez longue utilisation.

Par contre, nous devons ici faire une critique qui peut paraître assez grave encore qu'il faudrait l'appliquer à la presque totalité des méthodes déjà connues et dont nous avons cité quelques-unes. Au début de ce travail, nous avons donné une définition des plus simples et des plus générales des photosensibilisants et des radiosensibilisants, mais cette définition ne postule rien quant à l'effet biologique de la photo ou de la radiosensibilisation. Autrement dit, nous définissons un photosensibilisant comme une substance qui est un activateur de l'action des photons sur la matière vivante mais nous ne précisons pas quelle est cette action. Or, nous avons pris comme test, l'action sur la consommation d'oxygène d'une bactérie alors que d'autres ont pris comme test l'action léthale sur une bactérie, un protozoaire ou un arthropode, ou l'action mutagène ou l'action bactériostatique. En principe, rien ne s'oppose à ce qu'on prenne comme test d'une action pharmacodynamique un effet toxique, un effet mutant, ou

la variation quantitative d'un métabolisme quelconque à condition que ces effets soient assez caractéristiques et spécifiques de l'action pharmacodynamique étudiée. Ce n'est pas le cas avec notre technique ni d'ailleurs répétons-le, avec celles que nous propose en général la littérature sur les photosensibilisants. Un effet qui pourrait paraître assez spécifique des photons serait par exemple le brunissement de la peau humaine. Rien ne permet de dire que la diminution de la consommation d'oxygène du B.subtilis mesure la même propriété que celle qui provoque le bronzage. Nous pouvons même douter que le paramonochlorophénol dont nous avons vu l'effet puissant sur la respiration du B. subtilis en présence d'U.V. -ou lorsqu'il est préalablement irradié- soit un agent de brunissement (ce qui d'ailleurs serait à expérimenter). Il n'en reste pas moins que si l'on met en présence à une concentration de 10^{-4} du paramonochlorophénol et une suspension de B.subtilis on n'obient pas le phénomène que l'on constate si on irradie avec des U.V. En conséquence, la critique que nous avons formulée n'a qu'une valeur relative et ne peut au plus, que nous amener à préciser la notion de photosensibilisant. Ce substancif a une signification biologique aussi vague que variée. Il peut signifier : activateur du brunissement de la peau -d'une modification métabolique quelconque- d'une mutation d'une bactérie ou de sa mort et ceci, bien sur, sans que tel ou tel agent photosensibilisant porte en lui à la fois toutes ces potentialités pharmacodynamiques. Ceci revient à dire que tel photosensibilisant peut manifester ses propriétés par un effet léthal sur une bactérie sans provoquer de bronzage et inversement. En somme cette classe de substances pharmacodynamiques devrait être désignée avec une précision plus grande, introduisant par un complément d'objet la nature de l'effet biologique. On devrait dire photoactivateur de tel ou tel phénomène.

Nous allons voir maintenant comment nos résultats introduisent une nouvelle notion sur ces activateurs.

Les expériences réalisées avec les substances phénothiaziniques chlorées sur l'hétérocycle (chlorpromazine et prochlorpémazine) ou non chlorées (alimémazine), montrent que l'irradiation par une lampe à vapeurs de mercure transforme leurs molécules en molécules nouvelles stables et douées de pouvoir photomimétique.

Il est peut-être utile de préciser ce que nous entendons par ce terme nouveau en pharmacodynamie. Nous verrons que sa signification se dégage des considérations qui suivent.D'ores et déjà disons qu'on peut appeler photomimétique une substance qui provoque en l'absence de toute irradiation de la cellule cible, un phénomène biologique identique à celui obtenu par son irradiation en présence d'un activateur photosensibilisant.

La réaction photochimique obtenue par irradiation par une lampe à vapeurs de mercure (U.V. et lumière visible) d'une solution d'un dérivé phénothiazinique chloré sur ce noyau est complexe puisque nous avons vu par la chromatographie sur papier ou sur colonne qu'elle conduit à de nombreuses substances de colorations ou de fluorescences variées. Les effets sur la consommation d'oxygène des B.subtilis de ces solutions de phénothiazines chlorées et irradiées se maintiennent longtemps après l'irradiation et se manifestent sans que la cellule cible ait été irradiée antérieurement, simultanément ou postérieurement, ce qui démontre -1°) que l'irradiation d'un dérivé phénothiazinique provoque,surtout lorsqu'il est chloré, la formation de molécules actives nouvelles, que ces molécules sont stables et ne sont pas des molécules "activées" dont la "survie" d'ailleurs courte, ne pourrait être obtenue qu'en milieu rigide;

-2°) que leur action est indépendante de toute irradiation de la cellule cible.

En première conséquence, le schéma du mode d'action des photosensibilisants que l'on admet généralement, à savoir :

-sensibilisant + cellule cible = complexe cellule-activateur
-complexe cellule activateur + photons= réaction pharmacodynamique

doit être abandonné au moins pour certains photosensibilisants dont le schéma d'action devient :

-activateur + photons = molécules activées
-molécules activées ⟶ molécules stables nouvelles
-molécules stables nouvelles + cellule cible ⟶ réaction pharmacodynamique.

Il est évident qu'il n'y a pas là uniquement une discrimination de principe mais ouverture de nouveaux sujets d'investigation. En effet, comme nous l'écrivions par ailleurs : "Si dans certains cas ce sont les produits de la photolyse de l'activateur qui sont actifs, si ces molécules ne sont pas des molécules activées instables, les recherches à promouvoir s'orientent différemment : elles consistent évidemment à isoler, à analyser le produit réactionnel de la photolyse, à en reconnaître les structures actives et à réaliser si possible leur synthèse par les voies de la chimie ordinaire ; enfin à tenter leur utilisation thérapeutique" (9)
Ceci n'est d'ailleurs qu'un aspect des développements que suggèrent ces résultats.

Un autre aspect du problème que nous n'avons d'ailleurs dans cé travail que dévoilé sans en approfondir les bases physicochimiques, est celui-ci : on peut, nous l'avons vu, classer désormais les photosensibilisants en deux groupes :

-ceux qui irradiés produisent un effet sur la cellule cible non irradiée (on pourrait les appeler si le terme n'était pas trop lourd "photosensibilisants photomimétogènes");

- ceux qui, pour manifester leur action doivent agir sur la cellule cible en même temps que l'irradiation.

Or, il apparaît bien, d'après les résultats expérimentaux que nous avons obtenus avec les dérivés phénothiaziniques, que les photosensibilisants du premier groupe sont en particulier des molécules porteuses d'un atome de chlore sur l'hétérocycle : chlorpromazine, prochlorpémazine mais aussi alimémazine.

Connaissant l'action photosensibilisante de certains phénols comme le résorcinol, il était logique de rechercher si les phénols halogénés, en l'occurence les chlorophénols, se comportaient aussi comme des photosensibilisants photomimétogènes.

Les résultats expérimentaux que nous avons exposés montrent que l'hypothèse est largement confirmée. Après avoir vérifié l'effet nul du phénol, nous avons vu l'effet puissant de l'halogénation à condition qu'elle ait lieu en para par rapport à l'oxhydryle phénolique. En effet, d'après notre notation, nous avons :

phénol	conc. 1×10^{-4}	P.S. = 0
p.monochlorophénol	conc. 1×10^{-4}	P.S. = 85
o.monochlorophénol	conc. 1×10^{-4}	P.S. = 0

D'autre part, le mode d'action du p.chlorophénol le range dans les photosensibilisants mimétoformateurs puisqu'après irradiation du produit en l'absence de toute irradiation de la cellule cible, nous trouvons un PM de 92, 89 et 98 soit 93 (moyenne de 3 mesures).

Nous avons vu que l'halogénation en ortho n'avait pas d'effet. De même, sans avoir un effet nul, l'accumulation des atomes de chlore n'est pas aussi favorable qu'une seule substitution en para.

Les chiffres suivants explicitent cette constatation.

Phénol	conc. 1×10^{-4}	P.S.	0
- Paramonochlorophénol	1×10^{-4}	P.S.	85
- 2.4.dichlorophénol	2×10^{-5}	P.S.	10
- 2.5.dichlorophénol	2×10^{-5}	P.S.	52
- 2.4.5.trichlorophénol	2×10^{-6}	P.S.	5
- 2.4.6.trichlorophénol	2×10^{-5}	P.S.	13
- 2.3.4.6.tétrachlorophénol	2×10^{-5}	P.S.	18
- Pentachlorophénol	2×10^{-5}	P.S.	16

A la concentration de 2×10^{-5}, le 2.4.5.trichlorophénol non irradié effondre beaucoup trop la consommation d'oxygène de la suspension bactérienne (91 %), pour qu'une détermination du pouvoir photosensibilisant soit possible. (Cette molécule en présence de formaldéhyde conduit au G 11, aujourd'hui largement employé).

L'utilisation massive de ces chlorophénols comme antiseptiques, antifongiques, insecticides, etc... mérite peut-être d'être revue en fonction de ce qui précède, et suggère d'autre travaux. On sait aussi que certains virus, comme le montrait HIATT (22), sont inactivés par des matières colorantes en présence de lumière visible.

Une application de nos résultats pourrait être essayée comme moyen prophylactique des maladies virales dont le contage est amené par l'eau d'alimentation. Si en pratique, il est difficile d'assurer une irradiation continue et suffisante d'un grand débit sans l'installation d'un appareillage complexe, le problème est bien simplifié s'il consiste à ajouter à l'eau en quantité définie, une substance active soluble.

Du point de vue qui nous occupe en ce moment, à savoir les relations entre la structure chimique et le pouvoir formateur de molécules nouvelles et stables par irradiation, remarquons l'effet nul de substitution autre que par un halogène : en particulier l'effet nul du méta aminophénol et du paranitrophénol. Par contre, s'il existe un chlore en para, l'oxhydryle phénolique peut être remplacé par un autre radical puisque nous avons obtenu un résultat positif avec la parachloraniline (PS = 17 moyenne de trois mesures),alors qu'il n'y a pas d'effet photosensibilisant reconnu chez la base non chlorée. La présence d'un atome de chlore paraît donc souvent déterminante de la propriété étudiée. En fait, il est probable qu'il s'agit moins de la présence de tel ou tel atome dans la molécule que d'une structure électronique particulière qui serait déterminée entre autre par la présence d'un atome de chlore. Cette conception nécessite donc une étude plus approdondie du phénomène.

Nous devons aussi constater que les quelques essais que nous avons faits avec les rayons X ne nous font pas sortir du domaine des radiations électromagnétiques et qu'il serait intéressant de rechercher si les radiations corpusculaires conduisent à des constatations analogues.

Nous devons essayer maintenant, d'analyser les résultats plus difficilement interprétables que nous avons obtenus avec les dérivés du triphénylméthane parmi lesquels figurent l'éosine, l'érythrosine, le rose bengale, la fluorescéine et le violet de méthyle.

La comparaison des formules pourrait permettre d'éviter toute discussion.

Rappelons les valeurs de PS et PM trouvées :

	Concentration	PS	PM
Fluorescéine	5×10^{-5}	3	
Eosine	2×10^{-5}	31	27
Erythrosine	2×10^{-5}	47	54
Rose bengale	2×10^{-6}	32	14
Violet de méthyle	5×10^{-5}	16	5

Considérons aussi que la fluorescéine n'est pas halogénée, que l'éosine et l'érythrosine sont respectivement ses dérivés tétrabromé et tétraiodé (en 2457), que le rose bengale est une molécule d'érythrosine tétrachloré (sur le noyau jusqu'ici non halogéné), et que le violet de méthyle possède un chlore juxta nucléaire. Ces constatations suggèrent que le renforcement de l'action photosensibilisante et de l'action photomimétique n'est pas quantitativement le même pour les 3 halogènes et ceci doit conduire à des recherches nouvelles.

Restent à examiner les résultats de quelques investigations que nous avons faites avec la xanthotoxine, provenant de l'Ammi majus. Il faut reconnaître que la méthode que nous avons mise au point pour l'étude des photosensibilisants ne donne strictement rien avec cette molécule. Le produit agirait-il différemment des autres photosensibilisants ou bien l'effet biologique, comme nous l'écrivions plus haut, n'engloberait-il pas les phénomènes respiratoires de la bactérie utilisée ? Il est difficile de répondre avant d'avoir entrepris de nouveaux essais.

Peut-être apparaîtra-t-il qu'au terme de cette discussion, nous avons tiré moins de conclusions que nous n'avons suggéré de nouvelles recherches. Nous pourrions écrire ici qu'une thèse n'est jamais achevée et que si les résultats d'un travail suggèrent des investigations nouvelles à entreprendre, ce travail n'a pas été inutile.

C O N C L U S I O N S

1°) Nous décrivons une technique de mesure de l'activité des photosensibilisants. Cette technique permet, en particulier, l'exécution rapide de séries d'essais.

2°) En l'appliquant à l'étude des molécules photosensibilisantes, nous parvenons à une nouvelle théorie sur le mécanisme d'action de ces substances.
Nous démontrons, en effet, que parmi les photosensibilisants il en est dont l'action est due à une transformation photochimique de la molécule initiale.

3°) Il se dégage ainsi une notion inédite en pharmacodynamie, celle de "photomimétiques", substances qui agissent comme des photosensibilisants mais en l'absence de toute irradiation de la cellule cible.

4°) Nous pensons pouvoir relier la propriété photomimétogène à une structure électronique particulière que nous n'avons pas définie mais qui, d'après nos résultats, semble déterminée entre autres par la présence d'un halogène sur le cycle fondamental de la molécule initiale.

5°) Les notions précédentes sont déduites des faits expérimentaux que nous avons constatés dans l'étude de substances phénothiaziniques, de phénols halogénés et de dérivés du

triphénylméthane. Nous donnons le pouvoir photosensibilisant et photomimétique des produits étudiés.

6°) Nous proposons de nouvelles perspectives de travail découlant de nos travaux, mais que nous n'avons pas abordées.

7°) Nous donnons un aperçu thérapeutique très succinct de l'application en dermatologie des données de laboratoire.

VU, le Doyen
M.H. HERMANN.

Le Président de la Thèse
Professeur THIERS

VU et permis d'imprimer

LYON, le 8 Décembre 1961

Le Recteur, Président du
Conseil de l' Université

P. LOUIS.

B I B L I O G R A P H I E

1. BACIGALUPO et LUHRS.
Médecine et hygiène. N° 446, p.652, 20.11.1959.

2. BILLIG E. et NEIFAKH S.A.
Photodynamic action of 3,4-benzpyrene.
Byull Eksptl. Biol. Med., T.12, p.198, 1941.
C.A. T.42, p.3002h, 1948.

3. BLUM H.F. et KAUTZMANN E.F.
Photodynamic hemolysis at low temperatures.
J. Gen. Physiol., T.37, p.301, 1954.

4. BURRIS R.H.
Manometric Techniques.
Ed.BURGESS 426 South Sixth Street Minneapolis 15 Min.
p.156.

5. CALCUTT G.
The role of radiation in photodynamic action.
J.Exper. Biol. T.28, p.537, 1951.

6. CALCUTT G. et NEWHOUSE J.P.
Inhibition of the photodynamic action of 3, 4-benzpyrene.
Nature, T.161, p.53, 1948.

7. CARRAZ G.
Pouvoir radiosensibilisant du Largactil.
Thérapie, sous presse.

8. CARRAZ G. et BOUCHERLE A.
Congrés de Moscou, 1961.

9. CARRAZ G., DUGOIS P. et DUGOIS J.
Photosensibilisants et radiosensibilisants.
Thérapie, sous presse.

10. COHEN P.P.
Mamometric Techniques.
Ed. BURGESS 426 South Sixth Street Minneapolis 15 Min.
p.149.

11. DAVID R.
The biological action of eosin upon plants.
Compt. rend. trav. faculté sci. Marseille. T.1,p.10,1941.
C.A., T.40, p.3800, 1946.

12. EVELYN, FOWLKS et coll.
Lethal photosensitization of bacteria by 8 MOP. with light of long wavelength.
Jal. of Bactériology, T.78, p.821-833, 1959.

13. FAHMY I.R. et ABU-SHADY H.
Pharmacognostical study and isolation of crystalline constituent, Ammoidin.
Quart. J. Pharm. and Pharmacol., T.20, p.281, 1947.

14. FARRINGTON DANIELS Ph.D.
Photokinetics.
Jal. Investigative Dermatology, T.32, p.135, 1959.

15. FIALA S.
Photodynamic action of organic dyes on proteins.
Chem. Listy, T.39, p.14, 1945.
C.A. T.44, p.9493b, 1950.

16. FITZPATRICK T.B. et Coll.
Augmented pigmentation and other reponses of normal human skin to solar radiation following oral administration of 8-methoxypsoralen.
J. Invest. Dermat., T.25, p.187, 1955.

17. FOWLKS W.L., GRIFFITH D.G. et OGINSKY E.L.
Photosensitization of bacteria by furocoumarins and related compounds.
Nature, T.181, p.571, 1958.

18. FREEMAN P.J. et GIESE A.C.
Photodynamic effects on metabolism and reproduction in yeast.
J. Cell. and Comp. Physiol., T. 39, p.301, 1952.

19. HAI T.
Photodynamic effect on oral mucosa.
J. Chosen Med. Assoc. T.29, p.2120, 1939.
C.A. T.34, p.1696, 1940.

20. HEINMETS F., VINEGAR R. et TAYLOR W.
Studies on the mecanism of the photosensitized inactivation of E. coli and reactivation phenomenon.
J. Gen. Physiol. T.36, p.207, 1952.

21. HELMKE R.
Sensitizing E. coli B to irradiation with shortwave ultraviolet of 2537 A° by eosin.
Naturwissenschaften, T.42, p.515, 1955.

22. HIATT C.W.
Photodynamic inactivation of viruses.
Transac. New York.Acad.Sciences,T23,p.66, Novembre 1960.

23. KEHRMANN et DISERENS.
Ber. T.48, p.318, 1915.

24. KYO S.
Photodynamic effect of photocatalyst on the retinal motor changes due to light of various wavelenghts in the frog.
Japan J. Med. Sci. IV Pharmacol., T.12, p.9, 1939.
C.A., T.34, p.7306, 1940.

25. MATOLSTY A.G. et FABIAN G.
Measurement of the photodynamic effect of cancerogenic substances by biological indicator (Drosophila).
Arch. Biol. Hung., T.17, p.165, 1947.
C.A., T.43, p.7149i, 1949.

26. MUSAJO L. RODIGHIERO G. et CAPORALE G.
L'activité photodynamique des coumarines naturelles.
Bull. soc. chim. biol. T.36, p.1213, 1954.

27. RAAB O.
Z. Biol. T.39, p.534.

28. REGGIANINI O.
The protective action of some coumpouds against photodynamic hemolysis.
Biochim. terap. sper., T.29, p.226, 1942.

29. REGGIANINI O.
Changes in the anti-photodynamic power of serum under the influence of vitamins.
Boll. ital. Soc. biol. sper. T.24, p.573, 1948.
C.A. T.43, p.9185d, 1949.

30. RUBINSTEIN D.L., TUTACHKINA L.T. et GRISCHENKO D.E.
Photodynamic action of erythrosin on the contractile muscles proteins.
Doklady Akad. Nauk SSSR, T. 76, p.243, 1951.

31. SANTAMARIA L., RICCI H. et FEDI N.
The photodynamic effect of hematoporphyrin and other photodynamic substances on serum proteins.
Cong.intern.biochim. Resumes communes 3° Cong. Brussels, T.1955, p.148, 1955.

32. SCHULDNACHER H.
Photosensitization of mosquito larvae by fluorescent dyes. Biol. Zentr., T.69, p.468, 1950.

33. SIDI E. et BOURGEOIS-GAVARDIN J.
The treatment of vitiligo with Ammi majus Linn.
J. Invest. Dermat., T.18, p.391, 1952.

34. URBANI E.
New experiments on photodynamic action with respect to oxydation by amphibian larvae. Measurement of oxygen used in respiration. Ricera sci. ricostruz.
T. 15, p.561, 1945.
C.A. T.40, p.7417, 1946.

35. GRIGNARD.
Traité de Chimie Organique. T. 21, p.594.

TABLEAUX DES MESURES

Pages

I. Divers dérivés phénothiaziniques 27

II. Chlorpromazine

A- Irradiation habituelle -Cellules d'Ehrlich.. 33

B- Irradiation par rayons X -Cellules d'Ehrlich.. 34

C- Irradiation par rayons X -B.subtilis 35

III. Fractions chromatographiques de la chlorpromazine irradiée

A- Irradiation habituelle -Cellules d'Ehrlich.. 39

B- Irradiation par rayons X -Cellules d'Ehrlich.. 40

C- Irradiation par rayons X -B.subtilis 41

D- Résumé des tableaux III. A, B et C. 42

IV. Résorcinol. Deux phases chromatographiques du résorcinol irradié 45

V. Phénol et dérivés chlorés du phénol 53

Trois phases chromatographiques du p.chlorophénol irradié 54

Dérivés nitrés ou aminés du phénol.Parachloraniline 57

VI. Dérivés du triphénylméthane 61

VII. Xanthotoxine 65

TABLE DES MATIERES

	Pages
Introduction	1
Définition des photosensibilisants.Leur mode d'action.	4
Principales techniques de mesure	7
Technique personnelle	
Principe	10
Effet photosensibilisant	10
Effet photomimétique	11
Conditions favorables à des mesures sensibles....	12
Irradiation	13
Préparation de la Suspension de Bacillus subtilis	15
Dérivés phénothiaziniques	
Introduction	20
Divers dérivés.Formules développées	21
Chlorpromazine	31
Phénols	
Résorcinol	43
Dérivés chlorés du phénol	47
Dérivés du Triphénylméthane	58
Xanthotoxine	63
Résultats cliniques	66
Discussion générale	70
Conclusions	78
Bibliographie	80
Tableaux des mesures	85